台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.71 No.3 2022

Feature Article

185 Sustaining Agriculture under a Changing Climate
Chwen-Ming Yang and Chiao-Ling Hsiao

Research Articles

199 Identification and Development of Detection Reagent for Strawberry Mild Yellow Edge Virus
Chin-Chih Chen, Jyh-Nong Tsai, Mei-Ya Chen, Jia-Yi Liao, and Fen-Lang Chiang

209 Studies on the Physico-Chemical Changes in Fruits of Jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) 'Tainung No. 9', 'Tainung No. 12' and 'Tainung No. 13' during Development and Storage
Jhan-Hong Guo, Min-Chi Hsu, Kuo-Dung Chiou, Wen-Li Lee, and Yu-Shen Liang

231 Development of Nucleic Acid and Serological Methods for Differentiation of Chilli Veinal Mottle Virus and Pepper Veinal Mottle Virus
Ying-Huey Cheng, Chin-Chih Chen, Jau-Yeuh Wang, Chia-Dian Chiang, and Chin-An Chang

243 Study of Endophytic *Colletotrichum* spp. in Coffee Leaves in Taiwan
Chao-Jung Wu, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, Miao-Chun Lin, and Hui-Fang Ni

267 Analysis of Taxonomic Annotation Strategies for Soil Microbiota Amplicon Sequencing
Han-Wei Chen, Mei-Chun Lin, Suh-Jen Lin, Ching-Shan Tseng, and Yuan-Kai Tu

ISSN 2790-086X
9 772790 086007

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.71 No.3 2022

ISSN 2790-086X
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.71 No.3 2022

專題論述

185 氣候變遷下的永續農業
楊純明、蕭巧玲

研究報告

199 草莓病毒Strawberry Mild Yellow Edge Virus鑑定與檢測試劑開發
陳金枝、蔡志濃、陳美雅、廖家翌、江芬蘭

209 棗「台農9號」、「台農12號」及「台農13號」果實生育與貯藏期間理化特性探討
郭展宏、徐敏記、邱國棟、李文立、梁佑慎

231 開發可區分辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒的核酸和血清檢測方法
鄭櫻慧、陳金枝、王昭月、江佳典、張清安

243 咖啡葉片內生炭疽菌種類之研究
吳昭蓉、許淑麗、賴素玉、林妙純、倪蕙芳

267 土壤微生物擴增子定序物種分類指派策略之研究
陳涵葳、林美君、林素禎、曾清山、杜元凱

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

謝廷芳／農業試驗所植物病理組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
張永和／私立靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
黃炳文／國立中興大學應用經濟學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
楊純明／私立明道大學精緻農業學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

英文主編 (按筆劃序)

王寅東／美國德州農工大學
張宗仁／美國喬治亞大學
楊景程／美國佛吉尼亞理工大學
鍾光仁／國立中興大學植物病理學系

邀請領域主編

沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳煜焜／國立中興大學植物病理學系

編輯助理

王立蓉／《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第七十一卷　第三期　　中華民國一一一年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　謝廷芳
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　https://www.tari.gov.tw/jtar
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):185–197 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0001

專題論述

氣候變遷下的永續農業

楊純明 [1,2,*] 蕭巧玲 [3]

摘要

楊純明、蕭巧玲。2022。氣候變遷下的永續農業。台灣農業研究 71(3):185–197。

綜合從業人數、糧食產值及利用土地面積占比 3 大因素，農業可謂是全世界最大的產業，為地表眾多物種提供棲息地和食物。當農業得以永續經營管理時，將可以維護糧食生產、生養休息重要棲息地、協助保護水域及改善土壤健康和水質，非永續的農法則將對人類和環境產生嚴重影響。近年來氣候快速變遷情境衍生的地表氣溫上升、降水型態改變、極端天氣強度與頻率增加及海平面上升等 4 大物理性徵狀，帶給包括農業在內的各產業諸多逆境及天然災害衝擊和龐大財物損失。尤其當前世界人口仍不停地增長，對農產品需求不斷地上升，加上氣候變遷的潛在威脅，作為與世界經濟、人類社會、生態環境深厚聯結的農業，乃成為全球最重要的保護前線之一。本文旨在綜合已發表文獻中有關氣候變遷中如何永續農業的策略與措施，以及若干實務做法，提供達成持續性農業經營管理的資訊，並重點介紹氣候變遷情境下實施永續農業的機會和挑戰。最後，歸納唯有擬定整合社會、環境和經濟 3 大利益的政策和執行措施，社會大眾和農業關係人才會支持並促進永續的農業系統，也才能在不斷變遷的氣候情境下達到農業的永續。

關鍵詞：永續農業、氣候變遷、生態環境、天然資源、農業永續。

前言

綜合從業人數、糧食產值及利用土地面積占比 (含農耕與牧草土地) 三大因素而言，農業可謂是全世界最大的產業；其中，從農人口超過 10 億人，每年產值近 1,300 億美元，農牧用地高達地球 50% 可居住土地，為地表眾多物種提供棲息地和食物。因此，當農業得以永續經營管理時，將可以維護糧食生產和生養休息重要棲息地，協助保護水域，並改善土壤健康和水質。反之，非永續的農法將對人類和環境產生嚴重影響，破壞地球上各種生態系的平衡，長久以往將危及人類和其他物種的生活與生存。

很不幸的，由於人類的長期超採 (用) 濫墾，全球的天然資源 (如水、土壤、化石能源) 已逐漸枯竭，大量化石能源的燃燒與各種化學品的使用，又造成環境污染日趨惡化。農地則因為化學資材 (如農藥、生長劑、肥料、介質) 盲目投入而累積不可計數的毒害物質，並造成地力劣化及退化、土壤微生物平衡的破壞。再加上近年來氣候快速變遷情境衍生的地表氣溫上升、降水型態改變、極端天氣強度與頻率增加及海平面上升等 4 大物理性徵狀 (Core Writing Team *et al*. 2007)，更加劇了極端天氣與異常氣候的危害，以及帶給包括農業在內的各產業諸多逆境及天然災害衝擊和龐大財物損失。

凡此種種，吾人對於可持續資源管理的永續農業 (sustainable agriculture) 做法日益迫切，尤其當前世界人口仍不停地增長，對農產品需求不斷地上升，加上氣候變遷 (climate change) 的潛在威脅，作為與世界經濟、人類

收件日期：2021 年 8 月 2 日；接受日期：2022 年 5 月 16 日。
* 通訊作者：cmyang0616@gmail.com; cmyang@mdu.edu.tw
[1] 明道大學智慧暨精緻農業學系教授。台灣 彰化縣。
[2] 明道大學智慧農業研究中心主任。台灣 彰化縣。
[3] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

社會、生態環境深厚聯結的農業，乃成為全球最重要的保護前線之一。本文旨在綜合已發表文獻中有關氣候變遷中如何永續農業的一般性策略與措施，以及若干實務做法，提供達成持續性農業經營管理的資訊，並重點介紹氣候變遷情境下的實施永續農業的機會和挑戰。本文先從指陳農業永續經營的必要性開始論述，帶入根本的土壤劣化 (soil degradation) 與地力衰退將對台灣農業永續 (agricultural sustainability) 造成的深遠影響。接續說明氣候與農耕間的相互交感關係，再延展至氣候變遷對農業生產各面向的重大效應，最後引入與介紹現行全球大力推動的韌性農業和永續農業系統，作為因應氣候變遷的可行與實用對策。

農業永續經營的重要性

農業的是否能夠永續經營與發展，乃人類和環境的長存命脈，其重要性無庸置疑。永續農業或稱永續農業系統 (sustainable agricultural system)，旨在提供更有利可圖的營農收入，促進環境管理、提高農場家庭及農村社區的生活質量，並達到農業永續的終極目標。換言之，從務實的立場，永續農業的目的在於滿足當今社會對食物 (品) 和紡織品/纖維的需求，同時又不損害後代滿足其自身需求的能力。從新興的農業人類學 (agricultural anthropology) 亦證實，早期人類社會的農業發展軌跡已融合永續農業的意識與做法，混合於社會文化和自然環境的相互作用，以多樣作物栽培、農牧搭配、保護土壤及敬天惜物的兼容農業生態系與糧食生產系統的農法進行農耕操作 (Sarker 2017)。如此，能夠隨著時間的推移而倖存下來的系統，必然是因為它們具有高度的韌性、適應性和多樣性 (Brodt *et al*. 2011)，反之必殞落消失。然而，當人類文明隨著人口增長必須快速的增加糧食和纖維生產以應付大量需求時，自然資源基礎的退化，使得後來世代的生產和繁榮跟著下降，歷史上美索不達米亞、地中海地區、前哥倫布時期美國西南部和中美洲等古代文明的衰沒，即被認為受到非可持續農業和林業做法強烈影響。

永續農業和農業永續

承上，可知『永續農業』係一種可操作的農業 (耕) 生產系統，『農業永續』則是透過永續農業生產系統操作可達到的一種可持續農業生產的狀態。固然有許多不同的定義，也有各種學理、政策和實踐方法來實現永續農業的各種目標，但仍然可以歸納出一些共同的主題和原則，並在農業生產系統中涵括社會、環境、經濟 3 項同等比重的元素 (Brodt *et al*. 2011)。依據美國對於永續農業的法律定義 (《美國法典》第 7 篇第 3,103 節)，是指實施植物和動物生產的綜合系統，具有特定地點的應用及特性，可長期：(1) 滿足人類對食物和纖維的需求；(2) 提高農業經濟所依賴的環境質量和自然資源基礎；(3) 最有效的利用不可再生資源和農場資源，並在適當情況下整合自然生物循環和控制措施；(4) 維持農場經營的經濟可行性；(5) 提高農民和整個社會的生活質量 (National Institute of Food and Agriculture n.d.)。

經由以上定義與描述內容，永續農業系統可以視當地的環境與資源，擬定具經濟意義的農場經營管理策略與措施，透過長期合理的生產與利潤和生態環境的維護來營造農業的永續。

農業永續經營的重要性及必要性

由於地球上人口的不斷增長，隨之而來的是資源需求的上升，因為提高糧食生產來餵養人口的同時是資源消耗的增加。然而，部分已開發國家的食物浪費亦是不爭的事實。例如，食物浪費在美國是一個巨大的社經問題，據估計從農場到餐桌過程浪費了 30–40% 的食物 (Smith 2019)。這些的非永續現象，反應了社會需要創新的永續性秩序和做法，而農產業亦勢必尋求更積極的永續農業系統以因應此一現實的必要，除了保護地球的自然資源外，亦需要透過維護土壤質量、減少農地侵蝕和保護水資源來造福環境。

採行永續農業的操作系統可以使農業朝向一個可更加持續的生產方式，當然也難以避免一些缺點。傳統農作栽培多係在同一片農地上栽植單一作物或品種，雖然當季可刈取單一化

的大量收穫物，對於希望繼續生產大規模農產物的農民來說，永續性耕作將無法得到這樣的結果。其次，單一作物的耕作方式較單純化，並且適合大面積農機作業，農場工作曆相較於多樣化作物栽培方式簡明。永續農業則可在同一農地上獲得數量相對較少的多樣化農產品，卻可能因此增加市場販售的收益及穩定糧食供應，亦因而提高投施肥料的利用效率及減輕病蟲害的擴散。又因肥料與農藥的施用量減少，大幅降低地面水 (surface water) 和地下水 (ground water) 的水質污染，以及水流經過地點環境的連帶破壞 (Smith 2019)。

綜合前述，本文特予歸納 5 項農業永續經營的重要性及必要性說明如下：

餵養全球續增的人口

截至目前為止，世界人口總數已接近 79 億 (Countrymeters n.d.)，據估計在 2050 年以前更將新增 20 億人。欲餵養如此龐大的人口，勢必要有穩定增加的糧食生產，可以想見這會是多麼大的一項挑戰，農業如何永續經營以持續增加產量，確實是當前吾人必須面對與解決的嚴肅課題。

維護生態環境

農業的經營固然提供了保護生物多樣性的獨特機會，無可諱言卻也可能威脅到野生物種和其生存空間。農業的操作及擴張侵占 (害) 了野生動植物的棲息地，投施的化學品及農場有毒資材製造了農地污染，大量的施用化肥及牲畜飼養產生了溫室效應氣體 (greenhouse effective gases)。這些農業營運的作為帶給環境和生態重大衝擊，相對地亦使農業如何永續增添了許多有待克服的各樣挑戰。在此困境下，除了短期經濟收益，永續農業並兼顧自然資源和人力資源的長期管理來維護生態環境 (Brodt *et al*. 2011)。

降低農業經營製造出的污染

由於未有妥善的管制規範，農業在許多國家是主要污染源之一。各種農藥、化肥及其他有毒農用化學品不僅會留下殘毒於土壤中，也隨著灌溉水、土壤逕流水、滲漏水等途徑經過溝渠、水圳、河川污染了淡水及海洋生態系統，甚至於逸釋大氣中。有些毒害物質可以在環境和生物中代代相傳，例如部分農藥被懷疑會擾亂人類和野生動物的荷爾蒙系統，化肥則影響水道沿線生物和海洋珊瑚礁 (World Wildlife Fund n.d.)。採用農續農耕方法，可以降低農業經營過程中製造出的污染。

協助解決以農業為主的開發中國家貧窮問題

一些以農為主的開發中國家，對於其 3/4 的極端貧困人口來說，農業是唯一可行的生計選擇。惟在欠缺合適的生產技術下，農地生產力偏低，又因開墾周圍生物多樣性豐富的野生土地，導致貧困加劇和生物多樣性喪失的惡性循環 (World Wildlife Fund n.d.)。對這些國家的農民而言，如何導入友善耕作的永續農法，一方面提升農作產量，另方面不再盲目開墾荒地、破壞生態環境，將是其農業經營首要任務。

伸張灌溉水源的合理開發及有效使用

從表面的用水數據來說，農業部門消耗了地球上約 69% 的淡水。如果沒有創造性的保護與使用管理措施，農業生產將會消耗過多的水源並降低水質。如此，將對全世界的淡水系統產生不利影響，而不當的灌溉方式或對水源造成的污染，必將使得水資源更形枯竭、食品安全更受疑慮。在規律的降水型態受到氣候變遷的改變之下，乾旱及暴雨造成的乾濕對比情境將更加明顯，許多地方在水資源短缺的狀況將使得農業經營更為困難，糧食欠收也將讓貧窮國家人民陷入更深的困境。灌溉水源應當要有更深謀遠慮的合理開發、管理及利用，除了節水、省水，更當積極的力求水分的有效使用 (water use efficiency) 和提高農業的水分生產力 (water productivity)。

以永續農業觀點經營農業

牲畜排泄物發酵釋出溫室氣體等多元畜牧農場營運模式，被認為係大氣中溫室氣體累積的重要貢獻因子。農業生產開墾土地所砍伐原始森林或焚燒林木產生的二氧化碳，更將原本

積儲的碳釋放出來 (World Wildlife Fund n.d.)。因此，無論農耕或畜牧等農業經營活動，概需要以永續農業的觀點來規劃與經營，非但致力於逆境下的農業韌性調適作為 (adaptation)，也應該重視減少溫室氣體排放的農耕操作來助益於溫室效應緩解 (mitigation)。當農業經營得到可持續管理的理想狀態，又能兼顧調適與緩解的雙重功能時，農業即可以成為維護和恢復關鍵棲息地、幫助保護水域及改善土壤健康和水質的強固堡壘。

非營利國際農業組織對永續經營管理重要性的宣導和努力

除各國政府的農業部門之外，全球有相當多的非營利國際農業組織均協同致力宣導和努力於永續農業經營管理重要性。本文融合相關重點項目和世界野生動物基金會的做法 (World Wildlife Fund n.d.) 為例摘介，該組織曾多次邀集各方利害關係人召開會議，共同進行以下重要工作：(1) 評定並合力減少有礙於農業永續及加速氣候變遷的日益增加主要商品 (commodities)，以降低其負面影響；(2) 研擬並實行較佳的永續經營管理措施，以保護環境和維護生產者的管理底線；(3) 創建財政激勵措施，以鼓勵各方從事有關生物多樣性的保護；(4) 改進農業政策，以促進實施友善生態環境的農耕操作；(5) 確認永續農業有關的新營農收入機會，以保障從事永續農法生產者的經濟生存能力。

以上這些事項，可以提供農政單位參考與實務規劃，裨益於擘劃出適合國情和農業生態環境的永續農業藍圖，以及可供推動的路徑圖。

台灣土壤劣化與地力衰退影響農業永續

土壤係地球和人類最基本的天然資源之一，亦是農業生態系的基盤，人類生活依賴著土壤，因為它生產我們所需要的糧食及纖維，包括肉品、乳製品、小麥、水稻、玉米、大豆、棕櫚油、棉花等全球大宗農產品。土壤亦為農業之本，人類糧食中的植物生長在土壤中，動物的食物也直接或間接來自植物，且提供棲息住所，因此人類生活基本上離不開土壤。另外，眾所周知土壤尚且具有保安國土、涵養水源、淨化水與空氣、保育生態與景觀、緩和天氣、蘊育微生物等多樣功能 (multi-functinality)，乃人類珍貴的資產。基此，吾人應當保護愛惜土壤，不可予以污染破壞致使其失去原有的功能，才能成為永續農業的堅強後盾。

台灣土壤劣化問題

台灣在地理上位於溫帶及熱帶地區交接的亞 (副) 熱帶地域，屬於高溫、多雨、潮濕的海島氣候型態，又處於東亞颱風 (熱帶氣旋) 通道及斷層地震帶之間，致天災頻繁常傳災情。然而，在這些因子的交感下，又因眾多人口的糧食需要，採行異於溫帶一年一作的高度集約耕作方式，此種超限利用土壤的結果致使農地土壤容易引起地力衰疲退化，或引發忌地的症狀。環保署 2021 年的資料顯示 (Yang n.d.)，台灣常見的土壤劣化問題，大致涵蓋物理性、化學性及生物性 3 大層面；其中，物理性有土壤密實、結皮、沖蝕 (水蝕與風蝕) 及排水不良等，化學性有土壤酸化、鹽鹼化、肥力流失、養分不均及毒害物質蓄積等，生物性則有土壤有機質減少、大型生物與微生物密度減低及病蟲害生態劣變等。事實上，大幅人類活動及土地開發擴張之下，已普遍降低了土壤品質，如污染、土蝕、乾旱、水洗等情況，嚴重影響了土壤涵養生命的能力，長期以往將產生許多人口遷徙、森林濫伐、都市擴展甚至於糧食系統崩壞等負面結果。以上這些現象，在氣候變遷趨勢下預料將更形嚴重，吾人必須預先妥適規劃因應作為。

土壤的鹽化 (soil salinity)

土壤鹽分是近年來阻礙全球糧食安全和環境永續的主要及普遍挑戰之一 (Mukhopadhyay *et al.* 2021)。更糟糕的是，氣候變遷引發海平面上升的負面影響，加速了土壤鹽分的拓展，可能在不久的未來將問題蔓延至目前未受干擾的地區。歷經各方多年的努力之下，許多技術已被研發來趨緩土壤的鹽化，如應用改良劑、選育耐受基因型作物、合適的灌溉、排水及土地利用策略、保育性耕作 (conserevation farming)、植栽復育 (phytoremediation) 和生

物復育 (bioremediation) 等技術，這些方法也提供了土壤固碳、碳匯 (carbon sink)、保護和天然資源的循環利用，可被利用於永續農業的配套管理。近年發展出的複合式農地開墾策略 (integrated farmland reclamation strategy)，如結合地下排放水的鹹水養殖、耐鹽性品種共生高鹽分耐受性微生物、整合多項技術的綜合農耕系統等，其目的皆希望可以在氣候變遷情境下維持永續性的農業操作。

土壤的永續性耕作

雖然科學性的物理證據非常明確 (Core Writing Team *et al*. 2007)，氣候變遷議題上的政治化爭議卻仍存在世界各地，亦由於出現正反牴觸的言論，反而誤導真相、掩蓋事實，甚至延宕科研的進行。為了避開意氣用事的情緒化指責，必須以科學研究數據因地制宜的導引，並善用政策工具提供必要的經濟誘因和技術輔導，才能有利營造採行永續農業的友善氛圍。本文僅以世界上常用的不耕犁耕作 (no-till farming)、土表覆蓋作物 (cover crops) 及作物多樣性 (crop diversity) 為例，簡介土壤永續性耕作的做法如下：

不耕犁耕作

不耕犁耕作是一種農耕模式，也是土壤保護技術之一，旨在以不翻轉土壤與減少土層結構破壞的情況下種植作物。此種耕作可同時保留土壤中的養分及固碳狀態，利於維持土壤作為一個由礦物顆粒、有機物質、空氣、水和微生物組成的複雜且高度結構化的實體完整性，進而獲得改進土壤質地、增進土壤健康及減輕耕犁燃料與肥料費用支出的效果 (Magdoff & van Es 2009; Brodt *et al*. 2011)。

土表覆蓋作物

土表覆蓋作物或植物，亦是一項可進一步降低農場肥料與化學品使用、耕犁成本及消除雜草孳生的永續性耕作方法，並減少農場的碳足跡 (carbon footprint) (Magdoff & van Es 2009)。選用合適的覆蓋植物，尚可以增加產量與品質，如豆類和禾本科植物 (包括穀物的黑麥、小麥、大麥、燕麥) 都被廣泛使用，其他如蕓苔屬植物 (如油菜、芥菜、草料蘿蔔等)、蕎麥及一年生或多年生牧草 (如黑麥草、高粱、蘇丹草等) 也被利用。非豆科的覆蓋草類植物對於吸取前作留下的養分 (尤其是氮) 非常有用，由於往往具有廣泛根系而可減少土壤侵蝕、抑制其他雜草的萌發與生長，且自身產生大量生質殘留物，使有助於添加土壤有機物質。

作物多樣性

不同作物與品種對於環境因子有不同的偏好組合及不等的適應能力，因此在農場種植多樣種類的作物 (和牲畜) 或輪作，有助於降低極端天氣或病蟲害帶來的風險，以及市場條件改變或需求起伏引起的產銷失衡窘境。此外，作物和其他植物 (如樹木、灌木) 的多樣性增加，也有助於土壤保護、野生動物棲息地提供及有益昆蟲數量增加，這些都有利於農業在多變的人為和天然環境中持續的生產。此種又稱為生物動力型農業 (biodynamic agriculture) 的農耕模式，考量了農業生態系 (agro-ecosystem) 的平衡，能夠維持農田的永續性生產 (Paull 2011; Lejano *et al*. 2013)。以美國一些杏仁園常以三葉草和草類作為園區覆蓋作物為例，除了減少雜草干擾及水分消耗，也增加了生物多樣性，不僅有助於養分循環並為有益昆蟲提供棲息地及增加土壤有機質 (Brodt *et al*. 2011)。這種典型的永續農耕方式之一，潛在益處在於透過可保護較多的物種來保持動植物高度的遺傳多樣性，並為未來抗病蟲害的育種提供更多的遺傳資源，同時保護水土資源進而維護農地生產力。

氣候 (climate) 與農耕 (farming) 之相互影響

氣候及氣候分區

氣候，是指氣象因子 (如光照、氣溫、降水、風模式等) 的長時間變化，一地氣候的規律性變化，除了決定當地生物的種類與生活行為之外，亦左右民眾的作息和產業活動。氣候變遷對於不同地區帶來各樣不同的天氣和氣候型態改變，必將影響幾乎各個產業，農業自不例外。以美國佛蒙特州 (the State of Vermont)

為例，氣候變遷使其近年來的春季更為潮濕，夏季的乾燥時間更長，乾旱期間拉長，冬季則更加溫暖，總此延長了農作物的生長季節 (University of Vermont n.d.)。台灣的土地面積雖然不大，由於特殊的地理位置、緯度、海島型氣候及多元的地勢變化，形成了許多的氣候分區 (氣候資源區) (Chiang 1954; Chen 1957; Chiou *et al*. 2004)。透過這些氣候分區的研究探討，將有助於對動植物棲地基本特性的瞭解，並予分析氣候與動植物族群分布之關係及相互之影響 (Chiou *et al*. 2004)。在氣候變遷情境下，更需要調查各氣候分區發生的改變，逆境與天然災害造成栽培作物的影響，才能切中要點、恰到好處的研擬各別因應對策。

氣候及氣候變遷

2006 年的一部《不願面對的真相》(An Inconvenient Truth) 紀錄片，讓世界各地的民眾得知難以被忽視的全球溫暖化現象 (global warming)，大氣和海洋中過量的溫室氣體 (如二氧化碳、甲烷、水蒸氣、氧化亞氮) 使地球猶如被籠罩在溫室中，入射地表的太陽輻射熱量 (能) 難以散去，以維持循常的日夜平衡，導致地表溫度升高，並增加各種極端天氣事件 (如乾旱、暴雨、熱浪、寒潮、暴風雪等) 發生的頻率與強度，引發觸目驚心的氣候危機 (climate crisis)。因為快速的氣候變遷帶來的影響不僅是溫度及降水變化，更會是衝擊人們生活各層面的威脅，形成社經動盪、物種滅絕及糧食危機。

如前述，氣候變遷係指氣候 (或氣象指數) 在一段長時間內的波動變化，該段期間從數十年至數百萬年不等，而波動範圍可以是區域性或全球性。依此定義，氣候變遷其實自地球形成以來即持續的進行中，然而除了自然因素 (如太陽輻射、地球運行軌道變化、造山運動)，因為長期大量化石能源 (如煤炭、石油、天然氣) 的開採利用，經年累月燃燒支援人類的各項活動之下，釋放出來的溫室效應氣體促成了全球溫暖化，致使氣候加快變遷速度 (通常簡稱為氣候變遷)。近50年來全球暖化日益明顯，尤其最近的 30 年，氣候的快速變遷也愈形顯著，由政府間氣候變遷專門委員會 (Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC) 的報告 (Core Writing Team *et al*. 2007) 及歐盟的實際氣候變化均得到驗證。歐盟的研究報告指出，歐洲的人類系統和生態系統非常容易受到河流泛濫、乾旱或沿海洪水等重大氣候變化的影響，雖然某些北歐地區得到正向結果，但大多數國家是負面影響。而在不同地區的這些不同類型的組合影響會加劇其系統脆弱性 (歐盟南部和東南部地區的農業受到最大衝擊)。

有識之士乃大聲疾呼世界各國應當檢討其環境政策，限制一些溫室氣體排放的人類活動 (如工商發展、交通往來、開墾林地、集約農業等)，以期能夠控管氣溫上升及氣候變遷的速率 (National Research Council 2010)。據悉，2010–2020 年已是有溫度紀錄以來最熱的 11 年，倘若溫室氣體持續現行排放，地表溫度很有可能在未來數十年一直上升，科學家預測在 21 世紀內全球升溫可能達到攝氏 1.4−5.6 度之間 (Core Writing Team *et al*. 2007)。在未來 30 年、或甚至 10 年內達成淨零排放 (net zero emissions) 目標，已然成為全球共識及努力的方向。

氣候快速變遷對全球之全面性影響

許多研究分析氣候變遷對全球造成的影響，發現對於地球的物理和生物系統皆將產生不同的效應，且依不同地區有明顯差別，惟其影響的嚴重程度會隨著所涉及不同地區平均溫度的升高幅度而有很大差異。整體來說，氣候變遷對全球的影響屬於全面性的，許多地區最主要社經層面受到的影響在於水的供需問題，水資源供應可能會減少，嚴重干擾國計民生和產業活動；在生態與生物多樣性方面，破壞了生態平衡及生物棲息住所，增加了動植物滅絕的風險；由於預測的海平面上升和異常天候事件的發生，海岸將面臨更大的侵蝕及淹沒風險；在醫療保健上，暴露於起伏不定的天氣和氣候變化，民眾的健康可能會受到影響；對於農業與糧食生產，預期將呈現更大的波動，引起糧食供應和糧價上升的高風險 (Smith & Gregory 2012; Thornton *et al*. 2018; Kumar *et al*. 2019)，導致糧食供應鏈運轉失調。

氣候變遷惡化的控管

聯合國 2015 年通過的《巴黎氣候協定》(The Paris Agreement)，各國首次同意『本世紀末前，必須控制地球升溫於攝氏 2 度以內』，並且每 5 年必須檢討『國家自定減碳貢獻』(Nationally Determined Contributions; NDCs) [United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC) 2016]。此協定係一項具有法律約束力的氣候變化國際條約，由 196 個締約方於 2015 年 12 月 12 日在巴黎舉行的第 21 屆締約方會議上通過，並已於 2016 年 11 月 4 日正式生效實施。其主旨在相較於工業化前氣溫水準，以將全球暖化限制在遠低於攝氏 2 度為目標，尤以攝氏 1.5 度為佳。IPCC 在 2018 年發布新的研究報告，亦建議各國必須以 1990 年平均溫度為參考基準，且進一步希望：(1) 將地球升溫控制在攝氏 1.5 度之內；(2) 2030 年的碳排放減少 45%；(3) 在 2050 年達到淨零碳排 (net zero carbon emissions)，或稱碳中和 (carbon neutrality)，認為這是防止氣候變遷帶來人類嚴重災難的唯一方法 (UNFCCC n.d.)。

欲達到二氧化碳減排並進一步至淨零碳排並非易事，需要世界上所有國家一起努力，尤其一些碳排大國 (如中國大陸、美國、歐盟印度、俄羅斯、日本等) 更需要有決心並拿出實際減排行動。台灣的發電來源有高達近 75% 來自於火力發電，人均排放量比甚至高於中國大陸和日本，勢必要有一定作為，特別是過於低廉的油、水、電價格及再生能源的開發利用課題 (Yang 2016)。盤點國際上對於節能減碳議題的務實做法，本文歸納 6 項要點提供參考，期勉人人自許為『地球永續』尖兵。簡要說明如下：

能源轉型

減少二氧化碳排放是控制氣溫上升的首要工作，眾所周知二氧化碳排放主要來自燃燒化石能源，其最大部分是用來發電、作為機械動能、生產製造商品及便利民眾生活。為了顧及經濟、環境和民生需要，在日常已經離不開電力的前提下，勢必要以清淨再生能源取代化石燃料，才能實現降低碳排放量及達到多贏且永續的目的。

守護海洋

從減量的立場，可以善用大自然扮演的重要角色。海洋面積廣達 3 億 6 千 2 百萬平方公里，約占地球表面積的 71%，擁有 13 億 5 千多萬立方千米的水量 (地球上總水量 97%) (Anonymous n.d.)。吾人當盡力守護清淨海洋，發揮海洋吸收氣候系統中 90% 多餘熱量、調節地球上的雨水 (飲用水) 與天氣系統、提供食物等功能之外，更維繫其從大氣中吸收儲存 20–30% 人為排放二氧化碳的海洋碳匯機能。

養護森林

森林吸收二氧化碳使用於生長，儲存生質量於積材中，係天然的『碳儲庫』。根據聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization; FAO) 於 2011 年估計，全球森林儲藏近 6,520 億噸的碳，有效幫助地球儲存巨量的二氧化碳，對整體減碳極有助益。一如海洋面臨的危機，全球森林因為工商或農業利益大規模砍伐、焚燒及污染，使得森林生態逐漸失衡削弱其原有功能，甚至將已封存的二氧化碳釋放至大氣，助長氣候的變化與變遷。如何養護森林和海洋資源，維護甚或增進其碳匯，制定更嚴格的保護法規已刻不容緩。

在地消費、減少食物浪費

除了飲食，平時消費儘量選擇當季、在地產品，以減少運輸及存放所需能源。同時宣導惜食不浪費、減少廚餘及降低糧食足跡 (碳足跡) 的美德，從源頭減量做起，讓自己做一名聰明消費者，節能減碳從自身做起。

降低肉食比例

畜牧業係農產業和生活中增加全球溫室氣體排放的來源之一，多達 23% 的溫室氣體排放量來自農業和土地使用，而畜牧業即占了近 18%。由於牲畜飼養屬於食物鏈的高端，消耗大量的飼料，其排泄物又釋放大量助長氣候變遷的甲烷。因此，減低肉品的需求，將有助於減少溫室氣體的排放。

減用不易分解包材 (減塑生活)

購買食衣住行的物品，常會使用產品包裝，尤其是塑膠材料。如果可以減少重複包裝，或以可多次重複使用及可分解的材質與容器取代一次性塑膠包材，即能減少製造的資源消耗及後續的環境成本，也能減緩氣候變遷的推力。

氣候變遷之調適與緩解

在可預見的未來，氣候變遷走勢將依然如昔，對於氣候變遷下農業的未來，吾人必須要採行一系列與農業操作相關的調整措施，來維繫農業的常態運轉 (Smith & Gregory 2012)。目前國際上通常歸納為兩個主要的因應策略：『調適』與『減緩』。前者係尋求減少受到氣候變遷危害的影響，後者則是針對氣候變遷的根本原因致力於降低溫室氣體排放量。然而，在面對氣候變遷時此兩種策略皆屬必要而應並行，需要持續透過經營風險管理的單位，將氣候變遷的可能衝擊納入整體營運考量，預估風險發生機率與影響程度，並制訂風險應變的調適與緩解計畫及危機處理機制，以便及早提出預警。

本文建議農業的因應可分從機制面 (mechanism) 與執行面 (implementtion) 兩方向進行，機制面在於政策與結構的變革，由政府農業部門負責，執行面則可從農場的經營管理和農事工作者 (農民) 的技術解決方案予以調整，而兩者皆可依期程訂定短、中、長程規劃以收階段性具體成效。就基層的農場和農事作業，本文整理關於農作物和動物飼養的幾項可行做法為例，期抛磚引玉引發更多迴響：(1) 農作物，例如：透過遺傳育種等生物技術善用基因的多樣性，提高耐抗逆境韌性或選育高韌性新品種，以因應環境的改變；調整農場作業時序 (如種植或播種日期、採收與處理時間)，以配合或避開可預期的天氣型態波動；選用更合適的作物或品種，以適應生育季節的變化 (如溫度、濕度、雨量、病蟲害) 或新環境條件；開發耐抗逆境的韌性栽培管理技術 (如調整行株距、灌溉、施肥、遮陰、覆蓋)，以降低逆境或天然災害 (如高溫、低溫、乾旱、淹水) 的損失；透過監測系統偵 (檢) 測、作物輪作或綜合管理技術，以提高病蟲害管理的效果；改進灌溉及耕犁方法，以減少灌水損失、灌溉用水、增加土壤保水量及降低溫室氣體逸釋。(2) 動物飼養，例如：引進或選育更耐熱的牲畜品種及改良飲食與餵養模式，以舒緩熱緊迫危害；定期調整飼料配方及檢測水質，以提升飼養條件；改善動物畜舍的通風和冷暖氣系統，以維護牲畜飼養環境；加強回收或循環再生飼養用水，以有效增進飼養衛生管理；同步改進牲畜飼養和排泄物的管理方法，以減少溫室氣體的排放。

在上位農業部門層面的機制式調適措施，以歐盟訂定的 Common Agricultural Policy (CAP) 為例 (European Commission n.d.-a, n.d.-b)，相關內容整理如下：(1) 分析相對較脆弱的地區和糧食產業，評估改變物種和品種，以因應氣候變遷趨勢的需求和機會，尋求新的產業發展契機；(2) 大力支持農業研究和試驗性生產，評選適當物種和開發最適合新環境條件的品種，並開發創新的農耕和韌性栽培技術，以提升調適與緩解能量；(3) 透過推廣與訓練系統傳達 (授) 予各農業從業人員和農民團體，以提供有關農場管理的重要資訊、專業技術和建議來建構基盤的調適與緩解能力；(4) 在農村發展政策中融入創新思維及永續農業規劃，接受新技術、研究、創新及知識傳播的驅動，以因應氣候變遷和環境改變造成的新問題；(5) 擬定因應氣候變遷的相關農業政策，備擬可綜合或互補的不同政策工具和解決方案來應對氣候變遷帶來的挑戰，建立快速反應的訊息網絡，以支持在地農業的永續發展。

鑑於氣候變遷同時對社會、經濟及環境 3 大元素形成壓力，農業必須透過更可持續的生產方法來改善其各面向成效，而農業部門和農場/農民亦必須具備逆境及天然災害的調適能力來面臨氣候變遷的各項挑戰，並且採行緩解氣候變遷的知識和行動力。尤有甚者，所有地球村的居民可能需要在未來幾十年間秉持永續思維，針對農業生產和糧食消費行為兩方面做出根本性的改變 (Smith & Gregory 2012)。如此，在氣候變遷的狀況下，唯有遵循自然資源和農場的可持續經營管理軌道，並行社經與環境皆永續的農村社區，才能綜合實現農業永續的終極目標。

農業在氣候變遷中之角色及緩解氣候變遷功效

農業既是受到全球氣候變遷衝擊最大的社經部門，亦是溫室氣體 (以甲烷 CH_4 及氧化亞氮 N_2O 兩項氣體化合物為最大宗) 的主要生產者之一，因為農業經營管理直接依賴氣候變化進行相關農事活動，也因此農業是調適與緩減氣候變遷影響最有效進程的試驗場域。換句話說，除了調適氣候變遷各面向作用之外，農業尚可以透過減少溫室氣體排放和增加土壤中的碳匯、植物光合作用、植被與微生物的負碳排 (carbon negative) 效果來協助緩解氣候變遷。據估計，全球農業整體的二氧化碳減排潛力約為 5.5–6.0 Gt，相當於 2030 年全球二氧化碳的排放量。其中，將近 89% 可通過持續及提高土地和植被吸收有機碳的能力，其餘的 11% 可來自減排措施得到的效果 (Smith & Gregory 2012)。

為了促進農業的緩解功效，必須要有完整的做法來達成此一目標，並且將這些有用的做法納入實際的農業操作中。擬定調適與緩解氣候變遷影響的永續策略即為其一，重要的是整個農業供應鏈成員 (包括農民、農事服務業者和政策制定者等關係人) 皆當對因應氣候變遷的相關因應對策有所瞭解，才能夠雙向溝通、上情下達、下情上傳，在相互溝通分享及凝聚共識的氛圍下落實各種因應做法。為期達成農業永續經營的目的，則應當針對當地特殊的環境與資源透過系統化的研究，發展創新和有效的解決方案，才能因地制宜應對在地農場和農民面臨氣候變遷引起的各種挑戰。

為了實現以上這些目標，農政部門可協同研究機構為生產者和其他利益相關者提供滾動式的教育訓練機會和諮詢 (商) 服務，甚至可指定特定機關 (構) 作為研究資訊的資源中心和知識出口，加大多管齊下的行動力道。而該中心尚可協助聯合各級政府農業單位、農會、產銷班、農民、非營利組織及私部門，形成溝通連繫網絡或攜手進行密切合作。針對氣候變遷情境下的韌性農業及永續農業從事必要和客製化的應用研究，以分別解決一般性及特定的議題。從永續農業的角度，幾個重要的課題包括農業系統 (農業生態系加上糧食系統) 對於極端天氣事件的調適能力，水土資源的保護與合理而有效的使用，水質的維護與管理，農業廢水與牲畜排泄物的處理與創新用途，以及減少天然災害的防護與救助 (濟) 體系等。

因應氣候變遷之韌性農業系統 (resilient agricultural systems) 和永續農業

韌性農業系統

所謂的韌性農業系統或韌性農耕系統，主要在於面對諸如降水增加、乾旱缺水、極端天氣增多或氣溫升高/降低等氣候變遷衍生的常見情況時，農業 (耕) 系統仍能夠儘速的克服逆境或災害造成的損 (危) 害回復適度的產能。如此的農業生產回 (恢) 復力 (彈性)，對於維持產業經濟和生態環境的可持續性至關重要，亦是永續農業的關鍵環節之一。韌性或恢復的復原力重要性，在於大多數農業生態系統面臨的條件 (包括氣候、病害蟲族群、社會、政治背景等) 通常是高度不可預測的，而且從長遠來看穩定度偏低 (Brodt *et al*. 2011)，這也是追求農業的永續必須面對與克服的現實。

韌性農業系統解決方案

一套成功的韌性農業系統/架構應當不單在於『應付』突發狀況，更當能夠具備相關的直接和更具創造性的解決方案，從事前-事中-事後進行系列性、系統化的『控制』，始終給予指導、監督和管理，以確保各項因應措施皆按照規定與預定的方法、程序及規範進行。美國佛蒙特州大學的永續農業中心 (University of Vermont n.d.) 即提出以下關於韌性農業系統解決方案涵蓋的主題，值得學習和參考，包括：(1) 以不同方式管理土壤和水；(2) 多元化的農企業態樣 (尋求商機)；(3) 採用新的和不同的農企業；(4) 基礎設施的廣泛投資；(5) 栽培新的作物類型和品種。

對於農作生產而言，健康充沛的水土資源、配套產業鏈的農企業、完善的基礎設施及滿足市場需求的多樣韌性物種/品種等因素，確實是韌性農業系統及永續農業成敗的要件，政府相關部門可以集思廣益建立在地的自主韌

性農業系統，俾於調適當地的特殊條件，鞏固當地產業的創新發展機會。特別是提高作物種子的遺傳潛力，乃實現聯合國永續發展目標 (sustainable development goals; SDGs) 所需農業創新的最有效方式，以因應各地特有獨有的狀況 (United Nations Department of Economic and Social Affairs n.d.) 。植物育種可以透過能夠因應氣候變遷、病蟲害變異及資源限制的特定性狀基因導入，即生物性與非生物性逆境性狀，以及透過結合高精度表型體、細緻基因組信息、高密度遺傳圖譜、生物資訊學、遺傳建模和作物生長模擬方法等，來加速傳統育種選育出合適的新品種提高作物的永續性和生產潛力 (ERA-LEARN n.d.)。而且這些整合研究發展，亦可以提供達成所揭櫫 SDGs (尤其是第 2、6、8 項) 所需要的品質創新改進。

韌性農業系統和永續農業

美國是全球最大的農業生產國，加州又是農糧作物生產的重鎮，被認為處於因應氣候變遷的前線，故積極採取行動在氣候變遷下強化韌性農業系統以持續農業生產的時間較以往更加迫切 (Mazurek 2021)。加州政府的氣候與農業網絡 (California Climate and Agriculture Network) 內有列出氣候變遷下具有韌性農業系統內涵的永續農業生產方式與技術供各界參考，希望當地農場和農民多加採用以建立糧食供應的彈性與韌性。其部分內容類似於本文前述，因有異曲同工處及借鏡參採價值，本文特予摘整如次：

高效灌溉管理 (efficient irrigation management)

節約用水對任何農場都非常重要，尤其是在乾旱時期。當農場使用大部分能源於地下水的抽取時，灌溉效率成為減少化石燃料消耗和溫室氣體排放的關鍵。透過如滴灌、點噴、種植覆蓋作物、栽培旱作物等一系列的節約用水措施/技術，將可節水與節能。

使用再生能源 (renewable energy)

以最大限度的提高能源效率和擺脫化石燃料，是農場減輕氣候足跡 (climate foorprint)/碳足跡的重要步驟，具有包括再生能源生產與使用 (如再生能源驅動的農機)、減少石油為基元的肥料與農藥及降低農事操作對化石燃料投入的依賴等效果。

操作有機農業 (organic practices)

過去 50 年以來，農業的產業化與集約化導致傳統農業普遍仰賴以石油為基礎的農業化學品 (如除蟲劑、除草劑、化肥)，種種負面的結果促成禁止大多數合成化學品投入的有機農業 (耕) (organic farming) 興起。農場的有機化意味著減少溫室氣體排放，更潔淨的土壤、水和食物，以及有機與永續技術帶來額外的好處 (如增進土壤健康及肥力、提升食品安全)。

增進土壤健康 (increasing soil health)

如本文前述，農業可以透過減少溫室氣體排放和增加土壤中的碳匯來緩解氣候變遷，植物也經過光合作用從大氣中吸收二氧化碳充當碳匯，如此成為可持續減輕甚至協助扭轉氣候變遷巨大潛力的碳農業 (carbon farming)。而約 40% 的碳沉積到土壤中為細菌、真菌、原生動物和線蟲等微生物提供食物，再藉此轉化成礦物元素回饋土壤天然肥料。農場另可以施用堆肥、種植覆蓋作物、低耕或不耕等做法，促進固碳而增加有機質和增強土壤肥力。

維持綠化農業 (keeping agriculture green)

農地的綠化是維持綠化農業的不二法門，諸如重新造林牧場、恢復河岸綠帶、栽植綠籬和種植多年生植物等農地管理皆是有效措施，並因此可獲得提供野生動物庇護所、美化農場、吸引有益昆蟲進行授粉和形成天然的害蟲防治生態鏈等多種好處。這些綠化的植物及林木在其生物量中儲存碳，既保護土壤免受侵蝕與節約用水，又扮演緩解氣候變遷的角色。

降低牲畜甲烷排放 (reducing livestock methane emissions)

農業占加州溫室氣體排放量的一半以上，以生產牛肉和乳牛的甲烷排放為主要來源，另有造成水源污染的排泄物。於是，以草地輪流牧放牲畜的做法被大力推廣，一方面直接提供優質草料飼養牲畜，再方面牲畜糞便施予土壤有機肥，減少厭氧發酵逸釋溫室氣體。

草地放牧的牲畜管理 (pasture-based livestock management)

加州一半以上的土地是牧場，具有巨大的固碳潛力。這樣的草地放牧飼養方式，有助於土壤健康和微生物生命，也利於多年生草類在土壤中生長和儲存水分，值得推廣。

農地保護 (protecting farmland)

由於都市和工商發展，加州每年至少損失 40,000 mi^2 的農田。對於可持續管理的農場和牧場形成相當壓力，也威脅固碳和減排溫室氣體的潛力，影響食物供應、野生動物棲息地及生物多樣性，以至於氣候的變化，據此可見保護農地的重要與必要。

鼓勵在地食物消費 (supporting local food consumption)

美國的食物平均里程約 1,500 mi 才能到達餐桌，而運輸需要使用化石燃料和其他自然資源，並產生溫室氣體的排放。因此，消費在地食物將可縮短儲運距離，從而保護了這些資源。當農貿市場支持在地農民的農產品時，農民就可以留當地營農並成功種植糧食，在愛護地球的同時維持大眾的生存所需。

推動氣候友善政策 (pushing for climate-friendly policies)

支持當地氣候友善型農業和永續農業的方法有很多，但減少氣候變遷的損害、建立氣候調適能力及實施永續農業則需要重大的政策制定與宣導，諸如農田保護、健康土壤、水資源管理、再生能源、有機農業促進和其他永續農業需要的行政、立法和預算行動。作為社會的一分子，我們可以與政府和農民站在一起，敦促立法者通過法案來護衛大家的未來。

結語

本文最後要強調，永續農業並非一個單一且明確定義的最終目標，而是在社會、環境和經濟等 3 方面透過科學研究與應用實證不斷發展的農耕系統，並受到當時發生的問題、觀點和價值觀的影響與時俱進。顯然的，永續農業是一個理論與應用相互驗證的農耕系統，也是一項思維與務實之間的辯證，更是過去與未來理想的妥協 (Smith & Gregory 2012)。永續農業方法力求以這樣的邏輯論述利用天然資源、保護環境，使它們能夠持續再生其生產能力，並最大限度地減少對農地/農業生態系邊緣以外生態系統的有害影響。在氣候變遷部分，農業調適氣候變遷的能力在 30 年前不被認為是一個關鍵問題，但現在則受到越來越多的關注。如何在氣候變遷的情境下進行農業的永續管理與發展已成為顯學，亦是當前人類為求生存和創造繼起的生命，以及為求生活並增進未來世代生活的重大議題。其次，構成永續農業的內涵，可能會從一組條件 (如土壤類型、水資源、氣候、勞動力、生產成本) 變為另一組條件，從一種文化和意識形態變為另一種態樣，從而產生隨時空動態調整的連續性『永續』，而非『永續』與『非永續』二分法之間的爭議 (Brodt *et al*. 2011)。重點在於藉由規劃更多依賴養分和能量內部循環的生物整合農業生態系統，維持經濟可行的生產體系並減少潛在的負面干擾因子，以達到社會、環境和經濟的共享三贏。總而言之，唯有擬定整合社會、環境和經濟三大利益的政策和執行措施，社會大眾和農業關係人才會支持並促進永續的農業系統，也才能在不斷變遷的氣候情境下達到農業的永續。

引用文獻

Anonymous. n.d. Introduction to oceans. https://sites.google.com/site/haiyang951753/hai-yang-de-fen-bu-de-qu (visit on 07/08/2021) (in Chinese)

Brodt, S., J. Six, G. Feenstra, C. Ingels, and D. Campbell. 2011. Sustainable agriculture. Nat. Edu. Knowl. 3(10):1.

Chen, C. H. 1957. Taiwan's climate classification. Meteorol. Bullet. 38(1):1–9.

Chiang, B. R. 1954. Taiwan Climate History. Taiwan Island Studies Series. No. 26. Economic Research Office, Bank of Taiwan. Taipei, Taiwan. 220 pp. (in Chinese)

Chiou, C. R., Y. C. Liang, Y. J. Lai, and M. Y. Huang. 2004. A study of delineation and application of the climatic zones in Taiwan. J. Taiwan Geogr. Info.

Sci. 1:41–62. (in Chinese with English abstract) doi:10.29790/JTGIS.200410.0004

Core Writing Team, R. K. Pachauri, and A. Reisinger. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland. 104 pp.

Countrymeters. n.d. World population. https://countrymeters.info/cn/World (visit on 07/12/2021) (in Chinese)

ERA-LEARN. n.d. Project: Advanced tools for breeding BARley for Intensive and SusTainable Agriculture under climate change scenarios. https://www.era-learn.eu/network-information/networks/suscrop/1st-transnational-joint-call-on-sustainable-crop-production/advanced-tools-for-breeding-barley-for-intensive-and-sustainable-agriculture-under-climate-change-scenarios (visit on 07/08/2021)

European Commission. n.d.-a. Sustainable agriculture in the EU. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/sustainability_en (visit on 07/08/2021)

European Commission. n.d.-b. Tackling climate change. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/sustainability/environmental-sustainability/climate-change_en (visit on 07/10/2021)

Kumar, R., V. P. Singh, D. Jhajharia, and R. Mirabbasi. 2019. Agricultural Impacts of Climate Change. Vol. 1. CRC Press. Boca Raton, FL. 322 pp. doi:10.1201/9780429326349

Lejano, R., M. Ingram, and H. Ingram. 2013. Chapter 6: Narratives of nature and science in alternative farming networks. p.145–172. *in*: The Power of Narrative in Environmental Networks (Lejano, R., M. Ingram, and H. Ingram, eds.) MIT Press. Boston, MA. 225 pp. doi:10.7551/mitpress/9780262019378.003.0006

Magdoff, F. and H. van Es. 2009. Building Soils for Better Crops: Sustainable Soil Management. 3rd ed. Sustainable Agriculture Network Handbook Series. Book 10. Sustainable Agriculture Research and Education. Brentwood, MD. 294 pp.

Mazurek, B. 2021. 10 ways farmers can fight climate change. https://cuesa.org/article/10-ways-farmers-can-fight-climate-change (visit on 07/08/2021)

Mukhopadhyay, R., B. Sarkar, H. S. Jat, P. C. Sharma, and N. S. Bolan. 2021. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. J. Environ. Manage. 280:111736. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111736

National Institute of Food and Agriculture. n.d. Sustainable agriculture programs. https://www.nifa.usda.gov/grants/programs/sustainable-agriculture-programs (visit on 07/15/2021)

National Research Council. 2010. Advancing the Science of Climate Change. The National Academies Press. Washington, DC. 526 pp. doi:10.17226/12782

Paull, J. 2011. Attending the first organic agriculture course: Rudolf Steinr's agriculture course at Koberwitz, 1924. Europ. J. Soc. Sci. 21:64–70.

Sarker, M. N. I. 2017. An introduction to agricultural anthropology: Pathway to sustainable agriculture. J. Sociol. Anthropol. 1:47–52. doi:10.12691/jsa-1-1-7

Smith, A. 2019. The importance of sustainable agriculture. https://www.plugandplaytechcenter.com/resources/importance-sustainable-agriculture/ (visit on 07/12/2021)

Smith, P. and P. J. Gregory. 2012. Climate change and sustainable food production. Proc. Nutr. Soc. 72:21–28. doi:10.1017/S0029665112002832

Thornton, P., D. Dinesh, L. Cramer, A. M. Loboguerrero, and B. Campbell. 2018. Agriculture in a changing climate: Keeping our cool in the face of the hothouse. Outlook Agric. 47:283–290. doi:10.1177/0030727018815332

United Nations Department of Economic and Social Affairs. n.d. Do you know all 17 SDGs? https://sdgs.un.org/goals (visit on 07/10/2021)

United Nations Framework Convention on Climate Change. n.d. IPCC special report on global warming of 1.5°C. https://unfccc.int/topics/science/workstreams/cooperation-with-the-ipcc/ipcc-special-report-on-global-warming-of-15-degc (visit on 07/05/2021)

United Nations Framework Convention on Climate Change. 2016. Aggregate Effect of the Intended Nationally Determined Contributions: An Update. United Nations. Geneva, Switzerland. 75 pp.

University of Vermont. n.d. Farming & climate change program. https://www.uvm.edu/extension/sustainableagriculture/farming-climate-change-program (visit on 07/08/2021)

World Wildlife Fund. n.d. Sustainable agriculture. https://www.worldwildlife.org/industries/sustainable-agriculture (visit on 07/15/2021)

Yang, C. C. n.d. Soil deterioration problem and improvement in Taiwan. https://works.ilepb.gov.tw/01003_W_01/download/new_t/20050630_1.html (visit on 07/10/2021) (in Chinese)

Yang, C. Y. 2016. Did you know that Taiwan is one of the "big carbon emitter" countries? https://www.thenewslens.com/article/51948 (visit on 07/08/2021) (in Chinese)

Sustaining Agriculture under a Changing Climate

Chwen-Ming Yang[1,2,*] and Chiao-Ling Hsiao[3]

Abstract

Yang, C. M. and C. L. Hsiao. 2022. Sustaining agriculture under a changing climate. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):185–197.

Concerning the three major factors: the number of people who make a living, the worth of food production, and the proportion of land used, agriculture is the world's largest industry, providing habitat and food for many species on the earth. When agricultural operations are sustainably managed, they can preserve and restore important habitats, help protect watersheds, and improve soil health and water quality. Unsustainable practices will have serious impacts on humans and the environment. In recent years, mounting physical evidence derived from rapid climate changes, including rising surface temperature, changing precipitation patterns, increasing intensity and frequency of extreme weather, and rising sea levels, have brought many adversities and natural disasters to various industries including agriculture. In particular, the current world population is still growing continuously, and the demand for agricultural products is constantly rising. Because of the potential threat of climate change, agriculture, which is deeply connected to the world economy, human society, and the ecological environment, has become the world's most critical protection frontline. This article aims to synthesize the strategies and measures for sustainable agriculture in a changing climate and some practical practices in the published literature to provide information on achieving sustainable agricultural management, and to summarize the opportunities and challenges for implementing sustainable agriculture in the context of climate change. Finally, it is concluded that only by formulating policies and implementation measures that integrate the interests of society, environment, and economy, the public and agricultural stakeholders will support and promote a sustainable agricultural system, and can also lead to agricultural sustainability in the ever-changing climate.

Key words: Sustainable agriculture, Climate change, Ecology and environment, Natural resources, Agricultural sustainability.

Received: August 2, 2021; Accepted: May 16, 2022.
[*] Corresponding author, e-mail: cmyang0616@gmail.com; cmyang@mdu.edu.tw
[1] Professor, Department of Smart and Quality Agriculture, Mingdao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[2] Director, Smart Farming Research Center, Mingdao University, Changhua County, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):199–207 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0002

研究報告

草莓病毒 Strawberry Mild Yellow Edge Virus 鑑定與檢測試劑開發

陳金枝 [1,*]　蔡志濃 [2]　陳美雅 [3]　廖家翌 [3]　江芬蘭 [3]

摘要

陳金枝、蔡志濃、陳美雅、廖家翌、江芬蘭。2022。草莓病毒 strawberry mild yellow edge virus 鑑定與檢測試劑開發。台灣農業研究 71(3):199–207。

本研究由苗栗所採集的草莓 (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) 葉片呈現褐色嵌紋病徵或無徵狀者，以自行設計可涵蓋草莓輕型黃邊病毒 (strawberry mild yellow edge virus; SMYEV) 全長度鞘蛋白基因之上下游引子對 (SMYCPu/SMYCPd)，利用反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 可增幅出預估約 838 bp 的核酸片段，經核苷酸定序分析後，確認係屬 SMYEV。本研究另設計 SMY273u/SMY273d 引子對，進行 RT-PCR 以作為田間草莓 SMYEV 的發生調查，於苗栗和台中霧峰等地檢出 SMYEV 之比率約為 10.6%。本研究另開發 SMYEV 多元抗體，將 SMYEV-CP 約 726 個核苷酸序列選殖於表現載體 pET28a (+) 上，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 細胞內，誘導表現分子量約 26.7 kDa 之融合性蛋白，將此表現蛋白純化後做為抗原以製備進行多元抗體。於西方墨點法分析中，自製 (#206) 和市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba Ltd., Reinach, Switzerland) 均可與本研究所表現之 SMYEV-CP 蛋白及市售 SMYEV 正對照品於預估分子量位置產生正反應，且自製之多元抗體可成功檢出草莓植株上之 SMYEV，而不會與草莓健康組織有非專一性反應；在間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 反應中，受測草莓樣品之 SMYEV 正反應讀值 (A_{405nm}) 均在 0.15−0.21 之間，而相同樣品以市售抗體檢出者之讀值也僅在 0.26−0.54 間，可能因為草莓內之病毒濃度或多元抗體之力價低所致。本研究乃首次於國內草莓檢出 SMYEV 病毒，且完成此病毒分離株之分子鑑定。所研發之 SMYEV 多元抗體及 RT-PCR 檢測法，除了建立對草莓 SYMEV 之自主檢測能力外，更可應用於提升草莓健康種苗之生產品質。

關鍵詞：草莓輕型黃邊病毒、分子鑑定、多元抗體、RT-PCR 檢測。

前言

草莓具高經濟性，可鮮食也可加工，用途甚廣，為全球性的產業；主要生產地區包括歐美、中國大陸、日本及韓國。草莓也是深受國內消費者喜愛之蔬果品。依據行政院農業委員會農業統計資料 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx) 顯示 2020 年台灣的草莓栽培面積達 527 ha，年產值超過 14.7 億元；主要栽培產區在苗栗縣 (占 88% 以上)，包括大湖、獅潭、公館、銅鑼、通霄、南庄及苗栗等鄉鎮市。國內的草莓於栽種季節容易受病蟲害的危害而影響其生育與品質；病害主要包括有真菌、線蟲及病毒。國際間有紀錄的草莓病毒超過 25 種 (Martin & Tzanetakis 2006; Torrico *et al*. 2018)，依病毒種類不同對草莓的影響各有差異，也常見有感染草莓後不呈現病徵者，但當與其他病毒複合

投稿日期：2021 年 10 月 16 日；接受日期：2022 年 2 月 25 日。
* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。

感染時，則會加劇病徵表現而影響產能；此外，罹染病毒而不表現病徵者，其生長勢也會逐漸減弱 (Freeman & Mellor 1962; Bolton 1974; Dara 2015)。若以罹病植株作為繁殖用母本，則將導致幼苗出苗量變少。

草莓輕型黃邊病毒 (strawberry mild yellow edge virus; SMYEV) 為 *Potexvirus* 屬病毒成員，其自然寄主植物為草莓 (Hepp & Martin 1992; Jelkmann *et al*. 1992; Lamprecht & Jelkmann 1997)；病毒可藉由機械傷口感染、嫁接或匍匐莖帶病毒而傳播，或透過媒介昆蟲傳毒 (Krczal 1980)。國外報導 SMYEV 感染草莓造成葉緣黃化病徵，可使果實產量降低達 30%，感病品種會出現植株矮化及葉片扭曲等病徵 (Martin & Tzanetakis 2006; Tzanetakis & Martin 2013)；但也常有受 SMYEV 單獨感染的草莓不顯現病徵者 (Torrico *et al*. 2018)。

感染 SMYEV 的草莓尚未見諸於台灣正式文獻報告之前，本研究於 2017 年先行利用國外文獻所報導之 SMYEV 引子對 SMYEVdeta/SMYEVdetb (5'GTGTGCTCAATCCAGCCAG3'/5'CATGGCACTCATTGGAGCTGGG 3') (Thompson *et al*. 2003)，以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 檢測 2017 當年採集自苗栗之草莓樣品，首次篩檢到 4 個樣品可增幅出對應 SMYEV 之核酸分子片段，與預估約 271 bp 大小相近；進一步將此等 RT-PCR 增幅產物進行核苷酸定序，結果與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 上已登錄之SMYEV (Accession no. AJ577358) 之核苷酸相同度均高達 97% 以上，初步推斷可能為相同之病毒。進一步就 SMYEV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 的核酸分子進行選殖與定序，並同時建立對此病毒之 RT-PCR 檢測技術；此外，也製備針對 SMYEV 之多元抗體，以評估免疫檢測法對 SMYEV 之檢測效果。

材料與方法

SMYEV-CP 核酸分子鑑定

RT-PCR 法增幅 SMYEV-CP 核酸片段：本研究設計可涵蓋全長度 SMYEV-CP 及其兩端共約 838 bp 核酸片段之引子對 SMYCPu/SMYCPd (5'CACAATCGCCCTGGTCAGTA3'/5'GCACTCATTGGAGCTGGGTA3')，用於進行單步驟 RT-PCR 反應；參照商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corparation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行草莓葉片組織樣品之全量核醣核酸 (total RNA) 萃取；RT-PCR 反應條件乃參照單步驟 RT-PCR 試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 μL 反應液中分別加入 1 μL 之全量 RNA、12.5 μL 之 2× Reaction Mix、0.5 μL 之 SuperScript III RT/Platinum Taq Mix、各 1 μL 之 10 μM 上游和下游引子和 9 μL 之無菌水 [diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water]。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Göttingen, Germany) 中進行。設定反應程序如下：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 4 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、50℃下黏合 1 min，72℃下聚合 1 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 7 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行判讀。

SMYEV-CP 核酸片段選殖、核苷酸和胺基酸序列分析：利用 SMYCPu/SMYCPd 引子對進行 RT-PCR 反應所增幅出之預估 838 bp 大小之核酸片段產物，選殖於 pGEM-T 載體上 (Easy Vector Systems; Promaga, Madison, WI, USA)，以篩選出含有嵌入序列之選殖株，並送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wisconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 NCBI-GenBank 基因資料庫上已登錄的 SMYEV-CP 序列進行核苷酸及胺基酸比對分析。

以 RT-PCR 法調查國內草莓 SMYEV 之發生

本研究以自行設計之引子對 SMY273u/

SMY273d (5'AATTGTCGCTGATCTGAACG3'/5'GGAGTGAACTGGAGATTGGC3') 以 RT-PCR 法檢測台中霧峰區和苗栗兩地之草莓，以探討檢出有 SMYEV 之比率。樣本以呈現褐色嵌紋病徵或無症狀者之草莓葉片進行之，預估檢出之病毒核酸片段大小約 273 bp。

SMYEV-CP 蛋白表現及其多元抗體製備與檢測效果評估

本研究開發 SMYEV 多元抗體乃參考以往採用細菌表現蛋白以生產病毒鞘蛋白做為抗原之方式 (Chen *et al*. 2006)，首先設計引子對 SMYEVCP-PEu/SMYEVCP-PEd (5'GTGCACTTCCATGGGAGATCAGC3'/5'AGCTAATCCTCGAGACGTTAAGCG3') 用以增幅長度約 729 個核苷酸 (含轉譯終止碼 TAA) 之 SMYEV-CP 序列，並進一步選殖於表現載體 pET28a(+) 上 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 細胞內誘導融合性蛋白之生成，將預估分子量約 26.7 kDa 之細菌表現蛋白純化後，將其濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、連續 4 wk 的兔免疫注射以製備多元抗體 (#206)。

將本研究所自製 (#206) 和市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba Ltd, Reinach, Switzerland) 分別以間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 和西方墨點法 (western blotting) 進行草莓葉片樣品之測試比較。ELISA 步驟乃參照以往研究進行 (Clark & Adams 1977; Chen *et al*. 2016)，最終呈色反應加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP) (Amresco, Solon, OH, USA)，反應 40 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，樣品吸收值大於 2 倍之健康葉片吸收值者視為正反應。

結果與討論

本研究以草莓葉片組織為材料 (圖 1)，利用 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR 反應，可檢出對應 SMYEV 預期大小 273 bp 之核酸片段 (圖 2B)，進一步利用可增幅病毒全長度鞘蛋白序列之引子對 (SMYCPu/SMYCPd) 進行 RT-PCR 反應，可成功獲得大小與預估值相符的 838 bp 核酸片段 (圖 2A)，

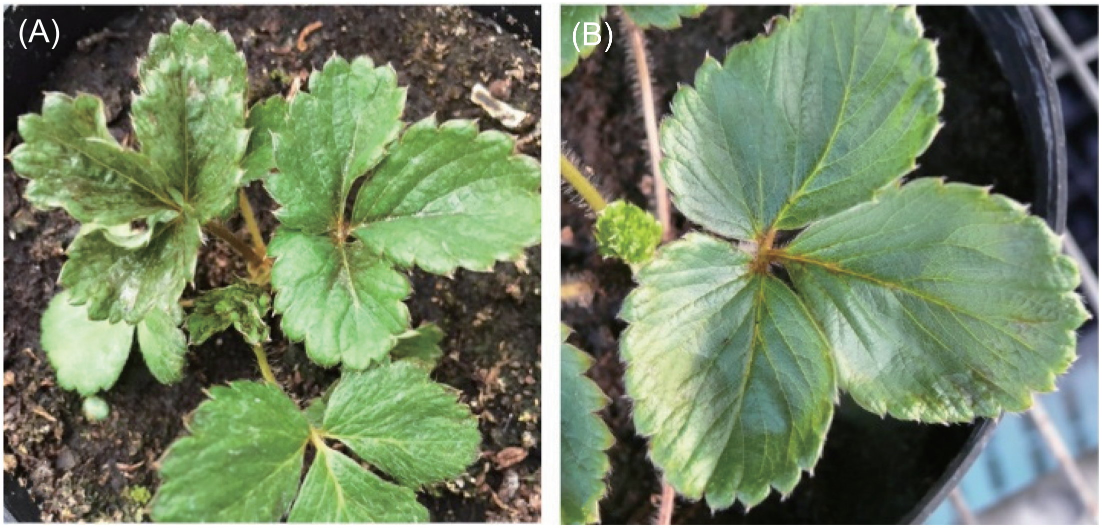

圖 1. 檢出有 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 之草莓罹病株葉片 (A) 呈現褐色嵌紋病徵者或 (B) 無徵狀者也有檢出病毒。

Fig. 1. Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) can be detected in strawberry plant leaves (A) showed brown mosaic or (B) asymptomatic symptom.

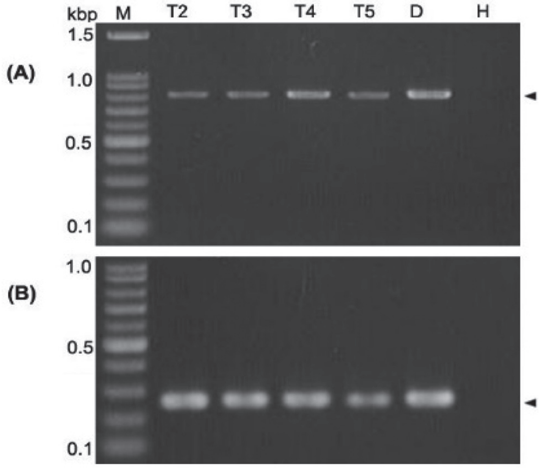

圖 2. 以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應檢測草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 之電泳圖。行 M：核酸分子量標幟；行 T2、T3、T4 和 T5：草莓罹病葉組織；行 D：SMYEV 正對照品；行 H：健康草莓葉組織。以引子對 (A) SMYCPu/SMYCPd 或 (B) SMY273u/SMY273d 所增幅之核酸片段分別為 838 bp 和 273 bp (箭頭所指)。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) in strawberries. Lane M: molecular marker; lanes T2, T3, T4 and T5: SMYEV-infected tissues; lane D: the positive control of SMYEV; lane H: the healthy control. The expected 838 bp and 273 bp of PCR products amplified by the primer pairs (A) SMYCPu/SMYCPd and (B) SMY273u/SMY273d (arrowed), respectively.

經選殖於 pGEM-T 質體上並進行核苷酸序列定序分析，結果顯示由不同草莓罹病葉片所獲得的 4 個選殖株 (T2、T3、T4、T5)，均具有 SMYEV 鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之特性，包含全長度 CP 共 726 個核苷酸及對應 242 個胺基酸 (圖 3)，且 CP 胺基酸序列均與 GenBank 已登錄之 SMYEV (Accession no. AJ577347、AJ577358、EU284709) 有高達 99% 以上的相同度 (表 1、圖 3)，依據鞘蛋白核苷酸序列分子鑑定結果顯示為 SMYEV 病毒。

後續由苗栗和台中霧峰區採集草莓樣品共 292 個樣品，以 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR 檢測 (圖 2B)，可檢出與預期 SMYEV 病毒核酸片段約 273 bp 者共有 31 個樣品，因此 SMYEV 之檢出率約 10.6%。

本研究也另外利用細菌外源蛋白表現系統表現出 SMYEV-CP 抗原，於西方墨點法中可與市售 SMYEV 多元抗體 (Bioreba) 於融合性表現蛋白分子量預估約 26.7 kDa 之位置產生正反應條帶 (圖 4A−B)，且於 indirect ELISA 檢測中與市售抗體之反應值 (A_{405nm}) 也高達 3.8 (表 2)，顯示所表現的融合性蛋白質確實具有 SMYEV-CP 之抗原性。且後續以自製的 SMYEV-CP 多元抗體 (#206) 於西方墨點法中，均可與 SMYEV-CP 表現蛋白及市售 SMYEV 正對照品於預估分子量處產生正反應條帶 (圖 4C、圖 5)，也可檢出草莓上之 SMYEV (圖 5)，但市售 SMYEV 正對照品可能因病毒濃度低而導致於西方墨點法中與自製和市售抗體的呈色反應不明顯 (圖 5)。於 indirect ELISA 檢測中，自製之 SMYEV 多元抗體可與市售 SMYEV 對照樣品產生正反應 (表 2)，且不與草莓健康組織產生非專一性反應 (圖 5)，顯示本自製多元抗體有預期之免疫檢測成效，尤其對其他薔薇科植物 (包括梅、李和櫻桃) 之健康葉片組織也不會產生非專一性反應 (結果未出示)，而且本自製抗體與受測植物之健康組織反應之鑑別度上，有優於市售 SMYEV 多元抗體的效果。此外，無論在 indirect ELISA 或西方墨點法中，本研究以細菌表現之 SMYEV 鞘蛋白做為反應用正對照品時，無論是與自製或市售之 SMYEV 多元抗體反應，均可獲得比市售 SMYEV 正對照品反應更為明顯之結果 (表 2、圖 5)，更適合做為 SMYEV 免疫檢測用之正對照品。

自製之 SMYEV-CP 多元抗體可應用於 indirect ELISA 及西方墨點法來檢測 SMYEV；然而本研究結果顯示受測的 SMYEV 樣品，以自製之多元抗體檢測時，其 indirect ELISA 讀值 (A_{405nm}) 之正反應值約在 0.15−0.21 之間，而相同樣品由市售抗體檢出之正反應讀值也僅在 0.26−0.54 間 (表 2)；對於健康草莓的樣品，使用市售抗體檢測所得之讀值與自製抗體相比有偏高情形 (0.24 vs 0.14) (表 2)。在西方墨點法檢測中，將已由 RT-PCR 法檢測出有罹染 SMYEV 之草莓組織樣品，與自製和市售抗體產生之反應條帶並不強烈 (圖 5)，甚至有無法

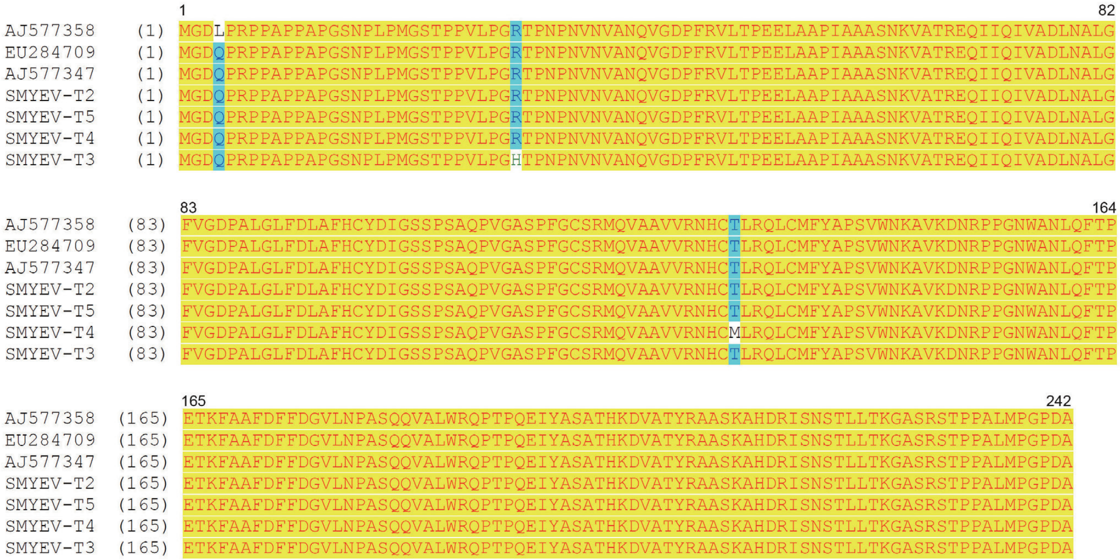

圖 3. 不同草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株之鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of different strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) isolates. SMYEV-T2, T3, T4 and T5 were identified in this study. Three SMYEV isolates (with accession no.) available in GenBank were used for comparison.

表1. 草莓strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株與登錄於 GenBank 之相同病毒鞘蛋白基因序列之比對。

Table 1. Percent identities of the nucleotides and deduced amino acid sequences of the coat protein (CP) gene of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) isolates to SMYEV available in GenBank.

	% identity of CP[z]	
SMYEV isolates	CP-nt	CP-aa
SMYEV-T2	100.0	100.0
SMYEV-T3	99.2	99.2
SMYEV-T4	99.6	99.2
SMYEV-T5	99.9	99.6
AJ577358	98.5	99.2
EU284709	98.5	99.6
AJ577347	97.9	99.6

[z] Sequence analysis was conducted by using Vector NTI Suite program (InforMax, Inc., Wisconsin, USA).

檢出之現象 (圖 5B)。由上述 2 種免疫檢測法評估結果，推測可能因草莓罹病樣品內的病毒濃度低，或是抗體力價太低所致。因此，整體而言 SMYEV 以多元抗體進行免疫檢測較容易產生結果不明確的現象。因病毒濃度低導致檢測不穩定之現象，也有見諸於國外的草莓病毒檢測報告中 (Conci *et al*. 2017; Fránová *et al*. 2019)。

因此，對草莓 SMYEV 的檢測鑑定上仍以核酸檢測法較為明確，尤其現今國際間已發表之草莓病毒檢測大多以核酸檢測法為之 (Posthuma *et al*. 2002; Thompson *et al*. 2003; Martin & Tzanetakis 2006; Ragab *et al*. 2009; Tzanetakis & Martin 2013)，加上草莓已有其他真菌病原已研發出核酸檢測法 (Lacourt *et al*. 1996)，未來草莓病原檢測將可以核酸檢測法為基礎，發展成同時檢測多種不同病原之組合。本研究設計之 SMYCPu/SMYCPd 引子對可應用於 RT-PCR 檢測時增幅出包含全長度 SMYEV-CP 及其兩端共 838 bp 之核酸片段 (圖 2A) ，此可做為 SMYEV 分離株增幅和選殖定序之用，以提供分子鑑定與分類之需。而 SMY273u/SMY273d 引子對進行 RT-PCR，可用以增幅 SMYEV-CP 區域內約 273 bp 之核酸片段 (圖 2B)，作為田間草莓 SMYEV 之調查鑑定。

由上述 SMYEV 鞘蛋白核酸分子特性、RT-PCR 檢測及病毒多元抗體反應之結果，均

表 2.　利用細菌表現之 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 融合性鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附分析法檢測草莓罹病株之效果。

Table 2.　Detection efficiency of the polyclonal antibody prepared from the bacterial-expressed fusion coat protein of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm})[y]	
Samples[z]	Ab-SMYEV#206	Ab-SMYEV-Bioreba
T2	0.189	0.526
T3	0.157	0.359
T4	0.145	0.441
T5	0.212	0.544
T72	0.119	0.226
T74	0.125	0.179
T76	0.150	0.264
WF1	0.178	0.264
WF2	0.157	0.231
WF3	0.174	0.236
WF4	0.162	0.207
WF5	0.184	0.265
WF6	0.067	0.183
WF7	0.111	0.295
D-CK	0.525	0.874
D-BEP	3.572	3.808
2H-CK	0.140	0.240

[z] Tested samples are preserved diseased strawberry materials in the laboratory.

[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA. D-CK represents the commercialized SMYEV control purchased from Bioreba. D-BEP represents the bacterial-expressed SMYEV coat protein.

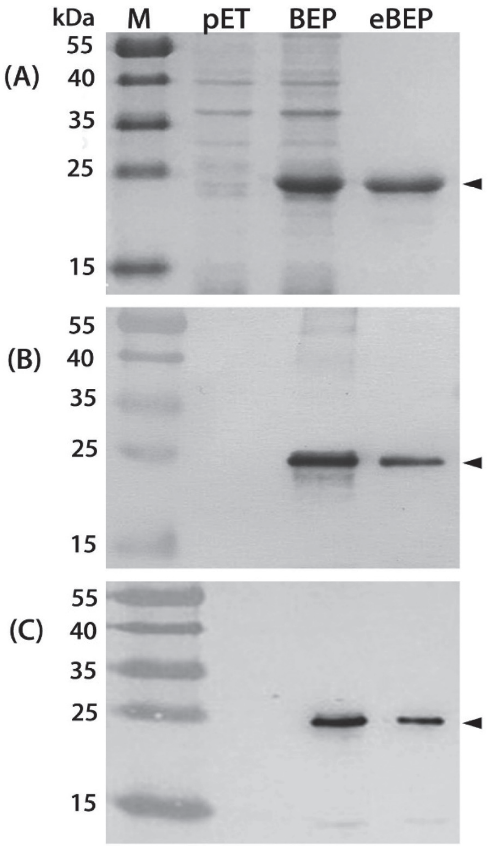

圖 4.　應用細菌大量表現的草莓 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 分離株融合性鞘蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) SMYEV 融合性表現蛋白 (26.7 kDa；箭頭所指) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Bioreba 公司出品和 (C) 自製之 SMYEV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28a(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 4.　Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assay of the bacterial-expressed coat protein (CP) of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV). (A) A 26.7-kDa bacterial-expressed fusion protein of SMYEV-CP (arrowed) was observed in the SDS-PAGE assay. The proteins were reacted with (B) the purchased polyclonal antibody of SMYEV from Bioreba, and (C) the antibody #206 prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without SMYEV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with SMYEV-CP insert; lane eBEP: the purified bacterial-expressed SMYEV-CP.

顯示受測的草莓罹病組織可檢出有 SMYEV，證實國內之草莓已有 SMYEV 發生，雖然所檢出病毒的樣品，不一定會引起明顯病徵，但因受病毒感染，草莓生長勢相對較弱，此與國外文獻記載草莓罹染病毒後不顯現病徵情形一致 (Tzanetakis & Martin 2013; Conci *et al*. 2017; Torrico *et al*. 2018)；因此，對於鑑定此病毒或草莓種苗繁殖的品質管控上，透過核酸分子檢測法確認草莓是否帶有此病毒相當重要。

本研究為首次以病毒之核酸分子檢測、核

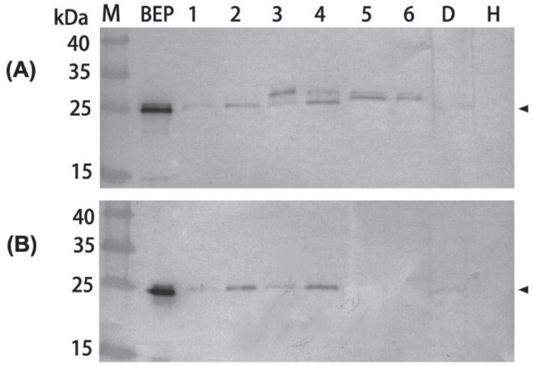

圖 5. 以不同來源之多元抗體進行西方墨點法，檢測草莓罹病組織之 strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)。受測樣品分別與 (A) 市售 (Bioreba) 和 (B) 自製 (#206) 之多元抗體反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：純化後之細菌表現 SMYEV 鞘蛋白；行 1–6：罹染 SMYEV 之草莓葉片組織；行 D：市售 SMYEV 正對照品 (Bioreba) (箭頭所指)；行 H：健康草莓組織。

Fig. 5. Detection of strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) by western blotting. The tested samples were reacted with (A) the polyclonal antibodies of SMYEV purchased from Biovera and (B) self-prepared in this study (#206). Lane M: protein marker; lane BEP: the purified lysate of bacterial-expressed SMYEV-CP; lanes 1–6: virus-infected strawberry leaf tissues; lane D: the positive control of SMYEV (arrowed) purchased from Bioreba Ltd.; lane H: healthy strawberry control.

苷酸定序及多元抗體生化檢測證明國內草莓有發生 SMYEV 之紀錄；目前國內栽培之草莓除 SMYEV 外，尚未有其他病毒病害之紀錄。

本研究也首度完成國內自製 SMYEV 多元抗體及 RT-PCR 檢測用試劑，此將有助於可提升我國對 SMYEV 之自主檢測能力，增進草莓無特定病毒種苗生產之品質。尤其於 2018 年 8 月經由行政院農業委員會動植物防疫檢疫局公告之「草莓種苗病害驗證作業須知」中，規範 SMYEV 為台灣產的草莓健康種苗之病毒檢定對象，本研究所開發之 SMYEV 引子對及其 RT-PCR 檢測法已應用為本驗證制度之病毒檢測標準，為確保台灣生產草莓種苗之健康品質而把關。

引用文獻

Bolton, A. T. 1974. Effects of three virus diseases and their combinations on fruit yield of strawberries. Can. J. Plant Sci. 54:271–275. doi:10.4141/cjps74-043

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Chen, C. C., C. A. Chang, and F. L. Chiang. 2016. Serological and molecular identification of *Nerine latent virus* infecting blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn). J. Taiwan. Agric. Res. 65:194–206. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2016.06502.09

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475

Conci, V. C., C. E. Luciani, M. C. Merino, M. G. Celli, M. C. Perotto, A. K. Torrico, E. Pozzi, G. Strumia, A. C. Dughetti, F. Asinari, L. R. Conci1, F. D. Fernandez, S. M. Salazar, N. G. Meneguzzi, and D. S. Kirschbaum. 2017. Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. Acta. Hortic. 1156:801–810. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1156.118

Dara, S. K. 2015. Virus decline of strawberry in California and the role of insect vectors and associated viruses. Plant Health Prog. 16:211–215. doi:10.1094/PHP-MR-15-0023

Fránová, J., J. Přibylová, and I. Koloniuk. 2019. Molecular and biological characterization of a new strawberry cytorhabdovirus. Viruses 11:982. doi:10.3390/v11110982

Freeman, J. A. and F. C. Mellor. 1962. Influence of latent viruses on vigor, yield and quality of British Sovereign strawberries. Can. J. Plant Sci. 42:602–610. doi:10.4141/cjps62-103

Hepp, R. F. and R. R. Martin. 1992. Occurrence of strawberry mild yellow-edge associated virus in wild *Fragaria chiloensis* in South America. Acta Hortic. 308:57–60. doi:10.17660/ActaHortic.1992.308.6

Jelkmann, W., E. Maiss, and R. R. Martin. 1992. The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potexvirus (SMYEAV). J. Gen. Virol. 73:475–479. doi:10.1099/0022-1317-73-2-475

Krczal, H. 1980. Transmission of the strawberry mild yellow edge and strawberry crinkle viruses by the strawberry aphid *Chaetosiphon fragaefolii*. Acta Hortic. 95:23–30. doi:10.17660/ActaHortic.1980.95.2

Lacourt, I., P. J. M. Bonants, M. P. Van Gent-Pelzer, D. E. L. Cooke, M. Hagenaar-De Weerdt, L. Surplus, and J. M. Duncan. 1996. The use of nested primers in the polymerase chain reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry. Acta Hortic. 439:829–838. doi:10.17660/ActaHortic.1997.439.137

Lamprecht, S. and W. Jelkmann. 1997. Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potexvirus as causal agent of the disease. J. Gen. Virol. 78:2347–2353. doi:10.1099/0022-1317-78-9-2347

Martin, R. R. and I. E. Tzanetakis. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. Plant Dis. 90:384–396. doi:10.1094/PD-90-0384

Posthuma, K. I., A. N. Adams, Y. Hong, and M. J. Kirby. 2002. Detection of *Strawberry crinkle virus* in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. Plant Pathol. 51:266–274. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00725.x

Ragab, M., K. El-Dougdoug, S. Mousa, A. Attia, I. Sobolev, S. Spiegel, S. Freeman, M. Zeidan, I. E. Tzanetakis, and R. R. Martin. 2009. Detection of strawberry viruses in Egypt. Acta Hortic. 842:319–322. doi:10.17660/ActaHortic.2009.842.58

Thompson, J. R., S. Wetzel, M. M. Klerks, D. Vašková, C. D. Schoen, J. Špak, and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. J. Virol. Methods 111:85–93. doi:10.1016/S0166-0934(03)00164-2

Torrico, A. K., S. M. Salazar, D. S. Kirschbaum, and V. C. Conci. 2018. Yield losses of asymptomatic strawberry plants infected with *Strawberry mild yellow edge virus*. Eur. J. Plant Pathol. 150:983–990. doi:10.1007/s10658-017-1337-z

Tzanetakis, I. E. and R. R. Martin. 2013. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America. Int. J. Fruit Sci. 13:184–195. doi:10.1080/15538362.2012.698164

Identification and Development of Detection Reagent for Strawberry Mild Yellow Edge Virus

Chin-Chih Chen[1,*], Jyh-Nong Tsai[2], Mei-Ya Chen[3], Jia-Yi Liao[3], and Fen-Lang Chiang[3]

Abstract

Chen, C. C., J. N. Tsai, M. Y. Chen, J. Y. Liao, and F. L. Chiang. 2022. Identification and development of detection reagent for strawberry mild yellow edge virus. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):199–207.

Strawberry (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) samples showed brown mosaic or symptomless were collected in Miaoli, Taiwan. Using the newly designed primer pair SMYCPu/SMYCPd specific to strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), an expected 838-bp DNA fragment containing the full-length coat protein (CP) gene of SMYEV was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide (nt) sequence of the amplicon was sequenced to verify the identity of the virus. Besides, the primer pair SMY273u/SMY273d was designed for RT-PCR to detect SMYEV in strawberry fields of Miaoli and Wufeng, Taichung, with a detection rate of 10.6%. On the other hand, the SMYEV CP gene with a length of 726 nt was cloned into the expression vector pET28a(+), and transformed into *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) cells to express a fusion protein of SMYEV CP with a molecular weight of about 26.7 kDa. The fusion protein was purified and injected into a New Zealand white rabbit to produce a polyclonal antibody against SMYEV CP (#206). In western blotting assays, the self-produced #206 as well as a commercially available polyclonal antibody (Bioreba Ltd., Reinach, Switzerland) can react positively with the *E. coli*-expressed SMYEV-CP fusion protein and the commercial positive control of SMYEV, and has no non-specific reaction to healthy strawberry tissue. However, due to the low virus concentration in strawberries, these two antibodies failed to detect SMYEV an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA). Here, we first report the molecular identification and incidence of SMYEV in domestic strawberries. The polyclonal antibody and the RT-PCR methods developed in this study can be applied to establish the capability of the detection of SYMEV in strawberry plants. The developed methods could be useful in strawberry propagation to produce SYMEV-free seedlings.

Key words: Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Molecular identification, Polyclonal antibody, RT-PCR detection.

Received: October 16, 2021; Accepted: February 25, 2022.

* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw

1 Associated Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

2 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

3 Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):209–229 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0003

研究報告

棗「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」果實生育與貯藏期間理化特性探討

郭展宏 [1] 徐敏記 [2] 邱國棟 [3] 李文立 [4] 梁佑慎 [5,*]

摘要

郭展宏、徐敏記、邱國棟、李文立、梁佑慎。2022。棗「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」果實生育與貯藏期間理化特性探討。台灣農業研究 71(3):209–229。

以棗品種「台農 9 號-新蜜王」、「台農 12 號-水蜜」及「台農 13 號-雪麗」為材料調查果實生長發育及貯藏特性之差異；結果顯示在果實生長發育中果重、果實縱徑、果實橫徑等呈雙 S 型曲線；「台農 13 號」於授粉後 100 d 達最大果實重量及總可溶性固形物含量超過 10°Brix，其餘台農品種分別於授粉後 120–130 d 達到最大重量及總可溶性固形物含量；果實成熟時，「台農 12 號」呼吸率及乙烯生成率最低，與「台農 12 號」比較，「台農 9 號」呼吸率是其 1.75 倍；乙烯生成率部分，「台農 9 號」是「台農 12 號」的 4 倍。棗台農系列各品種在果皮表面亮度為 50 以上，為接近成熟之採收適期，色彩濃度讀值「台農 9 號」約在 38、「台農 12 號」約在 30、「台農 13 號」約在 43 為接近成熟之採收適期，色相角度「台農 9 號」約在 97 度、「台農 12 號」約在 95 度、「台農 13 號」約在 110 度為接近成熟之採收適期。調查 20、5 及 1℃模擬貯運結果方面，「台農 9 號」在 5℃及 1℃貯藏期間果實腐損發生時間較早、腐損率較高，「台農 12 號」在 5℃及 1℃寒害率上升最快，「台農 13 號」在 5℃及 1℃寒害率表現略優對照「金桃」，腐損率表現在 5℃及 1℃略差於「金桃」品種，可溶性固形物在貯運期間表現優於「金桃」。

關鍵詞：印度棗、台農、雙 S 型曲線、果實理化特性、貯藏壽命。

前言

棗 (*Ziziphus mauritiana* Lam.) 果皮是翠綠色有光澤，果肉甜、脆、多汁，抗氧化能力強且營養豐富，又稱蜜棗、印度棗、棗子或青棗。原產於印度、緬甸、中國雲南一帶，巴基斯坦、孟加拉、澳洲及非洲等地，廣泛分布於熱帶、亞熱帶的乾旱地區 (Saran *et al*. 2006)，耐旱且環境適應力佳 (Awasthi & More 2009)，由於其具有非常多樣的基因型，是乾旱及半乾旱地區重要的經濟栽培果樹之一 (Razi *et al*. 2013)。棗具有多樣的附加價值，如葉可作為動物飼料，花朵富含花蜜與花粉可做為蜜源植物，根、莖、葉各部位萃取液也具有抗氧化、抑制微生物等功效，為具多種利用價值的果樹 (Singh & Meghwal 2020)。

棗何時傳入台灣已不可考，經多年的品種選育及栽培技術改進，使得品質受到消費者肯定，而成為冬季特色水果之一 (Chang 1999)，也是具出口潛力的水果之一；根據 2020 年行政院農業委員會農業統計年報，全台灣棗種植面積約為 1,900 ha，總產量為 32,799 Mg，主要種植面積為高雄市 (占 48.3%)，其次為屏東

投稿日期：2021 年 11 月 2 日；接受日期：2022 年 3 月 10 日。
[*] 通訊作者：justinliang@mail.npust.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[4] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所研究員兼分所長。台灣 高雄市。
[5] 國立屏東科技大學農園生產系副教授。台灣 屏東縣。

縣 (32.5%)、台南市 (14.9%) (Council of Agriculture n.d.)。農業試驗所近年選育出中晚熟優質「台農 9 號 - 新蜜王」(‘Tainung No. 9-Honey King’，簡稱「台農 9 號」，‘TN 9’)、中早生優質「台農 12 號 - 水蜜」(‘Tainung No. 12-Water Honey’，簡稱「台農 12 號」，‘TN 12’) 及早生優質「台農 13 號-雪麗」(‘Tainung No. 13-Shirley’，簡稱「台農 13 號」，‘TN 13’) (Guo *et al*. 2020) 等不同成熟期之品種，未來將可運用於產期調節及分散氣候變遷風險，以避免市場過於集中的產銷風險。

依據行政院農業委員會2020年農產品貿易統計資料顯示，棗外銷量從 2016 年 394,000 kg 提升至 2020 年 827,000 kg，顯示國外市場接受度逐漸增加 (Council of Agriculture n.d.)。打開國際市場除了非檢疫國家外，需要檢疫條件的國家可以蒸熱處理 (Vapor Heat Treatment) 或是低溫處理等方式以達檢疫條件，如日本方面接受棗以果心溫度達 1.2℃低溫 2 wk 的方式進行檢疫處理，但部分品種可能於檢疫後造成寒害 (chilling injury)，使得品質降低影響賣相，因此需要先進行棗品種冷藏試驗瞭解品種特性。由於不同品種棗對低溫耐受性不同，低溫貯藏雖然可有效延緩損失，但不適當的溫度亦會造成寒害，造成棗果實表皮褐化凹陷，果肉組織因溶質滲漏水解呈水浸狀 (water soaked)，並可能增加乙烯生成，而寒害的特性表現受品種特性、果實成熟度、肥培管理、貯藏溫度、貯藏時間及預措處理影響 (Lee 2019)。本試驗之目的為研究棗「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」品種果實生長發育特性與初步冷藏特性，並與現有市場早熟品種「雪蜜」進行比較，做為農民掌握栽培管理與採收適期之參考：另外，比較「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」果實與對照品種「雪蜜」和「金桃」之冷藏特性，提供貿易業者貯運與相關研究之參考。

材料與方法

果實生育和物化特性之調查

本試驗使用之材料為栽種於鳳山熱帶園藝試驗分所試驗田，以 10 年生野生型棗為砧木，嫁接供試驗品種：對照品種「雪蜜」(「大蜜」)、「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」樹高 3 m；行株距 6 m × 6 m，栽植環境以網室棚架栽培，試驗前選 10 株樹勢及生育狀況相近之植株供做調查，每株選留 2 強壯枝梢為主枝，每年每株施用三要素 (N、P、K 比例 4 : 2 : 5) 1,500 g，2018 年 9 月 30 日授粉後，開始進行本試驗之調查，調查至 2020 年 2 月 4 日，採樣時選大小外觀近似果實，作為果實發育及內容物之調查分析。果實於在田間採收前、田間採收後及進行實驗處理前亦無任何預措及藥劑處理。

調查項目及方法：在果實生長發育試驗中選擇調查棗「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」，及對照品種「雪蜜」研究調查上述棗品種授粉後不同生育日數之果實外觀、果實縱徑、果實橫徑、果重、果皮色澤、二氧化碳釋放量、乙烯釋放量、總可溶性固形物 (total soluble solid; TSS)、可滴定酸含量 (titratable acidity; TA)、醣酸比變化。每品種於開花時標定 300 個花穗，每個標定的花穗於授粉後 10 d 留 1 顆果實，並於授粉後 40 d 為第 1 次採樣，之後每 10 d 採樣 1 次。每次由 10 株標定的樹中隨機選 4 棵樹，每棵樹採 10 顆果實為 1 樣品，計 4 重複。試驗之果實，其成熟度依農民經驗判斷分為 6–9 分熟之果實，並進行試驗。各品種各成熟度採收時期說明：(1)「雪蜜」(「大蜜」)：6 分熟授粉後 95 d，7 分熟授粉後 100 d，8 分熟授粉後 106 d，9 分熟授粉後 111 d。(2)「金桃」：6 分熟授粉後 125 d，7 分熟授粉後 138 d，8 分熟授粉後 145 d，9 分熟授粉後 155 d。(3)「台農 9 號」：6 分熟授粉後 100 d，7 分熟授粉後 111 d，8 分熟授粉後 121 d，9 分熟授粉後 131 d。(4)「台農 12 號」：6 分熟授粉後 111 d，7 分熟授粉後 116 d，8 分熟授粉後 121 d，9 分熟授粉後 126 d。(5)「台農 13 號」：6 分熟授粉後 96 d，7 分熟授粉後 106 d，8 分熟授粉後 116 d，9 分熟授粉後 126 d。

果實外觀、果實縱徑、果實橫徑、果重量測

果皮色澤於每顆果實取 3 點調查後平均，以色差計 (color meter) 分別測定 L^*、a^*、b^* 之值。L^* (lightness，表示明亮度) 最高為 100，

最低為 0，數值愈小，表示顏色愈暗；數值愈大，表示顏色愈亮。以 $\tan^{-1}|b/a|$ 計算出之色相角度 (hue angle; θ value)，色相角度 0 度 = 紅-紫 (red-purple)；90 度 = 黃色 (yellow)；180 度 = 藍-綠 (bluish-green)；270 度 = 藍色 (blue)。色彩濃度 (chroma; C value) 以 $(a^2 + b^2)^{1/2}$ 來計算。果實縱徑、果實橫徑、果重則利用天平、電子式游標卡尺進行記錄。

果實呼吸率與乙烯生成率

取授粉後 40–130 d 之「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」及對照組「雪蜜」果實，每 10 d 採收並測量 1 次，經蒸餾水清洗並拭乾後秤重，再浸泡 500× 腐絕溶液 30 s 後取出陰乾，分別將果實裝入 3 L 之塑膠筒中，每塑膠筒 6 顆果實，每處理 4 重複，再放置於 20℃ 環境進行試驗。

呼吸率及乙烯生成率之測定及裝置，利用封閉式系統調查，密封 2 h 後，以 1 mL 之塑膠針筒抽取氣體樣品，利用 GC-8A 氣相層析儀 (gas chromatorgraph, Shimadzu, Kyoto, Japan) 之 flame ionization detector (FID) 測定 CO_2 及 C_2H_4 含量，層析管柱為 Porapak Q (80–100 mesh)，乙烯生成率以 $\mu L \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ 表示。而呼吸率則利用氣相層析儀之 thermal conductivity detector (TCD) 測定，層析管柱為填充矽膠 (silica gel)，呼吸率以 $mL\ CO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ 表示。

果實總可溶性固形物含量及可滴定酸

果肉總可溶性固形物含量之測定方式為，取整果無去除果皮去除果核，榨汁過濾之果肉汁液 1 mL，以電子屈折糖度計 (ATAGO PAL^{-1}, ATAGO, Tokyo, Japan) 分析，取至小數點下第 1 位，單位以 °Brix 表示，每處理 10 重複，每重複 1 顆果實。果實可滴定酸：果肉可滴定酸含量測定分析為取前果肉汁液 3 mL 加入 100 mL 之一次蒸餾水，以 0.1 N 氫氧化鈉滴定，並利用 TitroLine easy 滴定儀 (SCHOTT, Mainz, Germany) 滴定至 pH 值 8.1。以蘋果酸 (malic acid) 與氫氧化鈉之化學當量，求得可滴定酸，10 重複，以百分率 (%) 表示。

果肉硬度及果皮厚度

取授粉後 80–130 d 之「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」及對照組「雪蜜」果實，每 10 d 採收並測量 1 次，為瞭解各品種果肉硬度及果皮厚度差異，果肉硬度以物性測定儀 (EZ-Test 500N, Shimadzu, Kyoto, Japan) 之 5 號探針，直徑約 0.5 cm，測定時先設定探針深入距離為 10 mm。每顆果實測量上、中、下 3 點後平均代表每個果實之硬度，測量時無去除果皮，測定單位為牛頓 (N)。果皮厚度量測：於解剖顯微鏡下觀察果皮組織並量測果皮厚度，以銳利之解剖刀切取果實之果皮組織，每處理 4 重複，每重複 1 顆果實，每顆果實測量上、中、下各 3 點後平均代表每個果皮厚度。

不同貯藏溫度對「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」之影響

以棗「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」及兩個對照品種「雪蜜」及「金桃」，採收 6–9 分熟果實，運抵實驗室後，挑選外觀一致且果皮無損傷及病蟲害之果實，以 5℃及 1℃庫存，每顆果實使用疏果套來保護，放入保麗龍托盤，並取 6 kg 紙箱，每箱放入 2 層保麗龍托盤，每個托盤 20 顆果實，計 4 重複，並且紙箱內襯打孔聚乙烯袋 (polyethylene bag) 進行包裝，無藥劑處理。

貯藏期間的寒害及腐損情形

每 2 d 調查一次 5℃及 1℃貯藏期間寒害及腐損情形。其中寒害依果皮凹陷徵狀面積比例分為 5 個等級：0–4 級，0 (0%)、1 (1–10%)、2 (11–25%)、3 (26–50%)、4 (51% 以上)。腐損率表示則為貯藏期間果實腐損數量。寒害果及腐損果之判定以肉眼判定果實轉黃超過 2/3、果底出現黃熟褐斑或果皮出現腐敗病斑、不具商品價值，皆視為汰除。另調查 20℃下貯藏期間之果皮生理障礙 (physiological disorder) 情形。其中生理劣變徵狀如果皮凹陷、黃褐面積比例，分為 5 個等級：0–4 級，0 (0%)、1 (1–10%)、2 (11–25%)、3 (26–50%)、4 (51% 以上)。寒害指數、腐損率和果皮生理障礙進行觀察，計 4 重複，每重複 20 顆果實。寒害

指數與果皮生理障礙以指數為單位，腐損率以百分率為單位。

貯藏期間果實總可溶性固形物含量及可滴定酸

於貯藏期間第 0、10、20 d 調查 20、5 及 1℃貯藏期間果實總可溶性固形物含量及可滴定酸，每盤隨機抽樣 1 顆果實總可溶性固形物含量及可滴定酸取樣，每 1 顆果實為 1 重複，計 4 顆果實。測量方法同材料方法一。

資料整理及統計分析

資料以 Microsoft Office Word 與 Excel 進行資料輸入及圖表繪製，試驗數據以 Strategic Application System (SAS) 統計分析軟體 (版本 SAS Enterprise Guide 7.1) 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，以學生氏 *t* 檢定法 (Student's *t*-test at $P \leq 0.05$ level) 比較差異性。

結果

果實生育期間物理特性變化

由圖 1A–C「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」在授粉後 50–70 d 時期，果重、果實縱徑、果實橫徑表現呈現平緩的成長，其中以「台農 13 號」在果實橫徑及果重發育在 70–100 d 較「台農 9 號」、「台農 12 號」及對照組「雪蜜」快，於授粉後 70 d 就開始進入快速生長期，上升趨勢較快也較其他 3 個品種高。在圖 1D 果型指數 (果實縱徑/果實橫徑) 的觀察方面，以整體平均來看，授粉後 40–50 d 果型指數由 1.25 逐漸變扁圓 1.14，於 50–60 d 第一階段 1.14−1.15 的生長發育趨緩，授粉後第 90–110 d 果型指數 0.99 會上升 1.01，110–130 d 果型指數由 1.003−1.009 變化趨緩；採收適期時各試驗品種的果型指數平均方面，對照組「雪蜜」授粉後 110 d 為 0.97，「台農 9 號」授粉後 130 d 為 0.98，「台農 12 號」授粉後 130 d 為 1.09，「台農 13 號」授粉後 110 d 為 0.95；果型指數及其數值變化，可做為品種識別的依據，亦可做為果實成熟採收的參考。

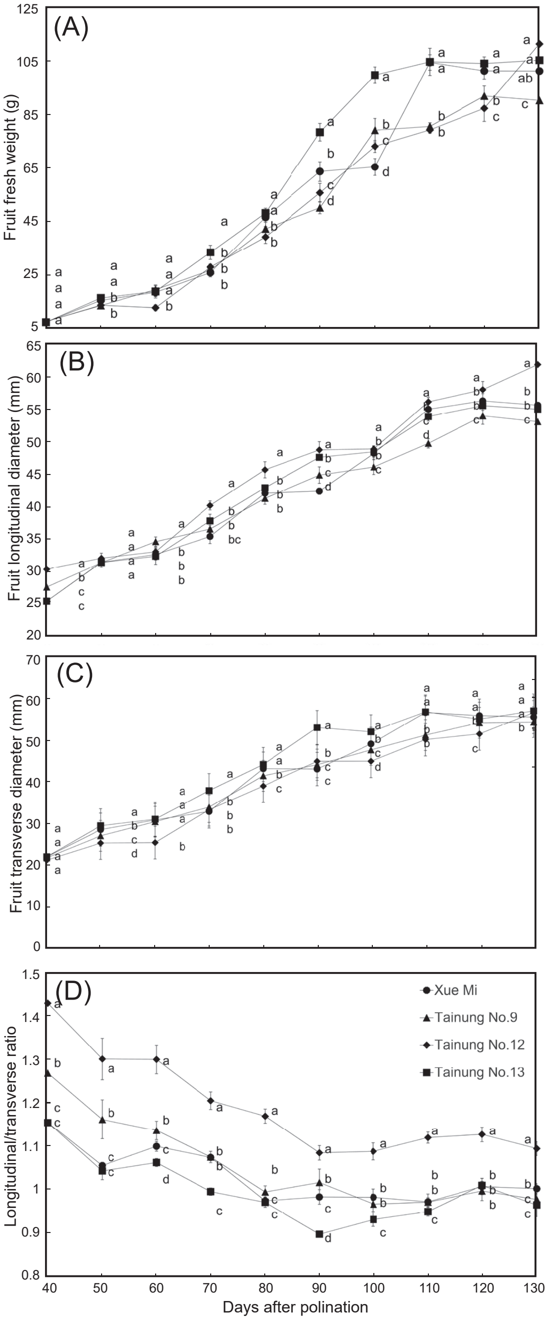

圖 1.　棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」之果實生育期間 (A) 果實鮮重、(B) 果實縱徑、(C) 果實橫徑及 (D) 縱徑/橫徑比之變化。

Fig. 1.　Changes in fruit (A) fresh weight, (B) fruit longitudinal diameter, (C) fruit transverse diameter and (D) longitudinal/transverse diameter ratio of 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13' and 'Xue Mi' jujube during growth and development. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

果實生育過程內容物變化與生理特性

總可溶性固形物含量

在果肉的總可溶性固形物含量變化如圖 2A，各品種可溶性固形物含量在授粉後 40–90 d 均低於 7°Brix，其中 50–70 d 總可溶性固形物含量總體平均由 4.8°Brix 下降至 4.2°Brix 後再上升 5.5°Brix，90–100 d 總可溶性固形物上升速率較快由 6°Brix 上升到 9°Brix，其中以「台農 13 號」總可溶性固形物含量上升最快，於授粉後 100 d 後可達 10.8°Brix 以上，「台農 13 號」與對照組「雪蜜」100–120 d 可溶性固形物呈較快速上升；採收適期各試驗品種之總可溶性固形物，「台農 13 號」與「雪蜜」同為 120 d 可溶性固形物可以達 13°Brix 以上，「台農 9 號」及「台農 12 號」於 120–130 d 總可溶性固形物呈快速上升，「台農 9 號」到 130 d 可迅速上升到 13.1°Brix，「台農 12 號」則 130 d 達到 12°Brix，「台農 12 號」為本試驗總可溶性固形物較低的品種；「台農 9 號」、「台農 12 號」與對照組「雪蜜」在總可溶性固形物含量變化曲線隨授粉後日數增加而上升，「台農 13 號」變化曲線於 130 d 後呈開始下降。

可滴定酸

圖 2B 顯示其中 40–50–80 d 總可滴定酸含量總體平均由 0.1% 下降至 0.07% 後再上升 0.11%，90–100 d 總可滴定酸含量上升速率較快由 0.11% 上升到 0.18%；100 d 後接近成熟後各試驗品種有的可低定酸反應變化不一，其中「台農 12 號」、「台農 13 號」與「雪蜜」同為 110–120–130 d 會下降後再上升的表現，「台農 9 號」則為 110–130 d 持續上升的表現；採收適期各試驗品種，對照組「雪蜜」總可滴定酸含量於授粉後 110 d 為 0.35% 為本試驗中最高的品種，「台農 9 號」於授粉後 130 d 為 0.29%、「台農 12 號」於授粉後 130 d 為 0.22% 是本試驗中可滴定酸最低、「台農 13 號」於授粉後 110 d 為 0.31% 與對照組「雪蜜」無顯著差異。

糖酸比

圖 2C 顯示本試驗在授粉後 40–70 d 糖酸

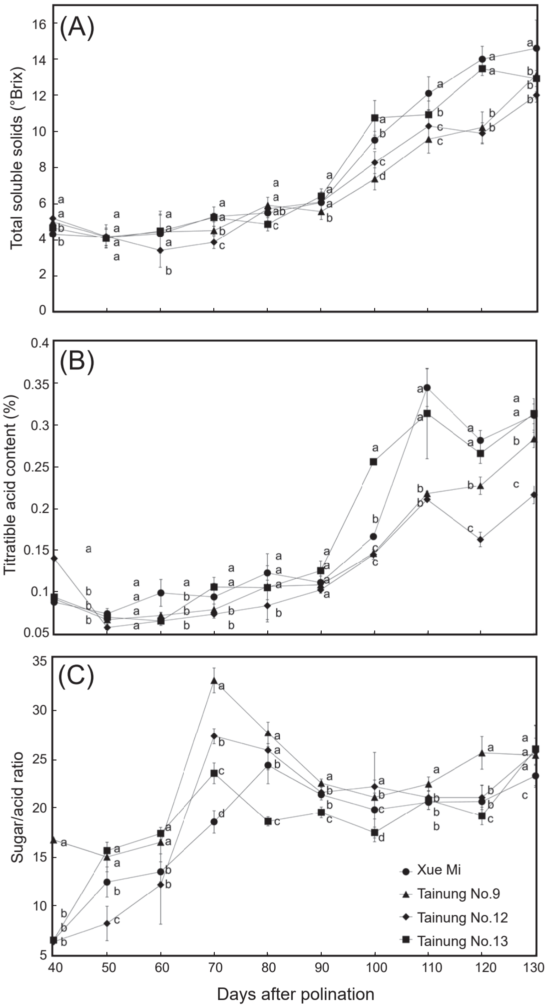

圖 2. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」之果實生育期間 (A) 總可溶性固形物、(B) 可滴定酸及 (C) 糖酸比之變化情形。

Fig. 2. Changes in fruit (A) total soluble solids, (B) titratable acidity and (C) sugar/acid of ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’ and ‘Xue Mi’ jujube during growth and development. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

比由整體平均 9.2 上升至 25.7，70–100 d 後由 25.7 下降至 20.3，於 100 d 後開始各品種總可溶性固形物上升快速不同，又各品種本身可滴定酸含量高低差異，故影響各品種於最後之採收時期糖酸比上升速率及表現不同；採收適期各試驗品種糖酸比，對照組「雪蜜」於授粉後 110 d 為 20.7 並且於 130 d 最高可達 23.4，「台

農 9 號」於授粉後 130 d 為 25.5、「台農 12 號」於授粉後 130 d 為 25.8、「台農 13 號」於授粉後 110 d 為 19.3 並且於 130 d 最高可達 26.1。

果實生育過程呼吸率變化

呼吸率變化如圖 3A，顯示試驗品種整體授粉後果實發育有兩個波峰，第一波峰為授粉後 40–60 d 其呼吸率會由 5.2 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 快速上升至 15 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 達第一次高峰，後 60–100 d 會由 15 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 逐漸下降至 5.8 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1}，於 100–120 d 第二次由 5.8 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 逐漸上升至 12.9 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 達第二次呼吸率的高峰；以各品種角度來看「台農 13 號」於 100–110 d 其呼吸率的上升率為試驗品種中最早及最快，「台農 9 號」於 110 d 開始快速增加；採收適期各試驗品種呼吸率方面，對照組「雪蜜」於授粉後 110 d 為 8.52 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 並且於 130 d 最高可達 13.8 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1}，「台農 9 號」於授粉後 130 d 為 15.8 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1}、「台農 12 號」於授粉後 130 d 為 9 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1}、「台農 13 號」於授粉後 110 d 為 8.77 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1} 並且於 130 d 最高可達 11.4 mL CO_2・kg^{-1}・h^{-1}。以授粉後 130 d 進行各試驗品種之呼吸率比較，「台農 12 號」是本試驗品種中呼吸率最少的，「台農 13 號」為是「台農 12 號」的 1.27 倍，「雪蜜」是「台農 12 號」的 1.5 倍及「台農 9 號」約是「台農 12 號」的 1.76 倍。

果實生育過程中乙烯生成率變化

乙烯生成率變化如圖 3B，顯示試驗品種整體授粉後果實發育有兩個波峰，第一波峰為授粉後 40–70 d 其乙烯生成率會由 1.65 μL・kg^{-1}・h^{-1} 快速上升至 8.58 μL・kg^{-1}・h^{-1} 達第一次高峰，後 70–100 d 會由 8.58 μL・kg^{-1}・h^{-1} 逐漸

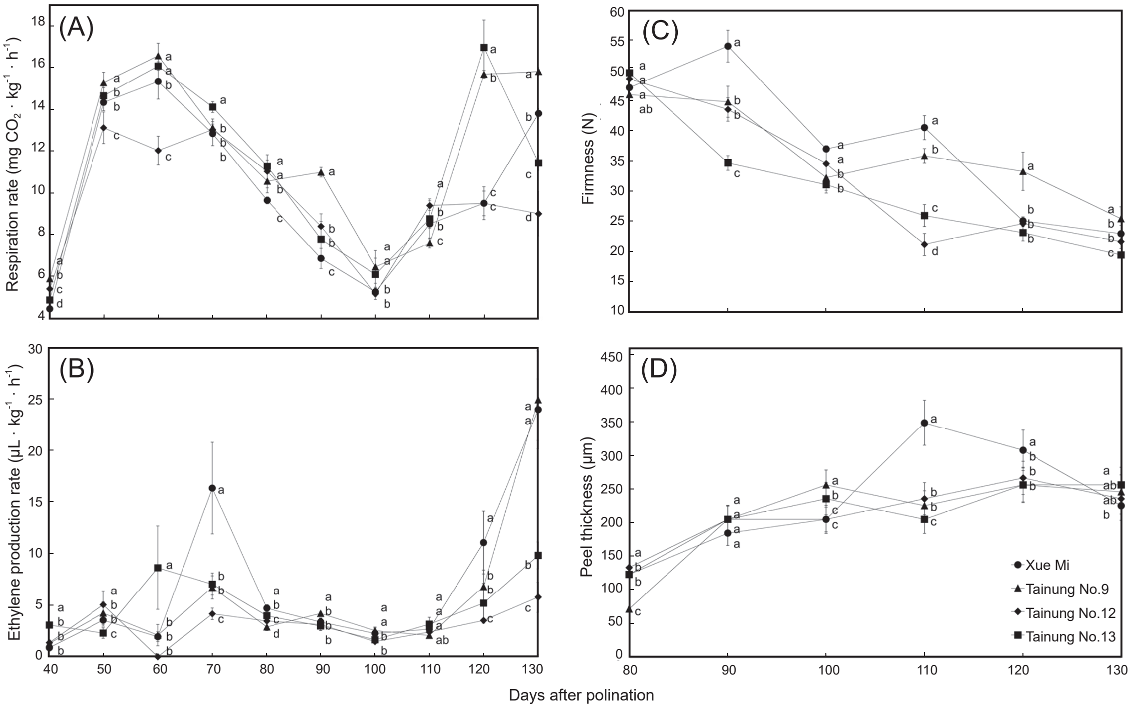

圖 3.　棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」之果實生育期間 (A) 呼吸率、(B) 乙烯生成率、(C) 硬度及 (D) 果皮厚度之變化情形。

Fig. 3.　Changes in fruit (A) respiration, (B) ethylene production, (C) firmness and (D) peel thickness of ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’ and ‘Xue Mi’ jujube during growth and development. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

下降至 1.98 μL・kg^{-1}・h^{-1}，於 100–130 d 後開始第二次由 1.98 μL・kg^{-1}・h^{-1} 逐漸上升至 16.14 μL・kg^{-1}・h^{-1} 達第二次乙烯生成率的高峰；以各品種角度來看「台農 13 號」於 100–110 d 其乙烯生成率為試驗品種中最快及量最高，「台農 9 號」於 110 d 開始快速增加；採收適期各試驗品種乙烯生成率方面，對照組「雪蜜」於授粉後 110 d 為 2.67 μL・kg^{-1}・h^{-1} 並且於 130 d 最高可達 23.99 μL・kg^{-1}・h^{-1}，「台農 9 號」於授粉後 130 d 為 24.9 μL・kg^{-1}・h^{-1}、「台農 12 號」於授粉後 130 d 為 5.78 μL・kg^{-1}・h^{-1}、「台農 13 號」於授粉後 110 d 為 3.15 μL・kg^{-1}・h^{-1} 並且於 130 d 最高可達 9.85 μL・kg^{-1}・h^{-1}。以授粉後 130 d 進行各試驗品種之乙烯生成率比較，「台農 12 號」是本試驗品種中乙烯生成率最少的，「台農 13 號」是「台農 12 號」的 1.7 倍，「雪蜜」及「台農 9 號」是「台農 12 號」的 4 倍。

果實生育過程中果實硬度與果皮厚度變化

圖 3C 顯示在授粉後第 80 天時「台農 9 號」果實硬度為 46 N，「台農 12 號」果實硬度為 48.6 N，「台農 13 號」果實硬度為 49.6 N 及「雪蜜」果實硬度為 47.2 N，各品種皆隨成熟度增加而果實硬度下降；在採收適期觀察果實硬度而言，「台農 9 號」在授粉後第 130 天的果實硬度為 25.4 N，「台農 12 號」果實在授粉後第 130 天的硬度為 21.6 N，「台農 13 號」果實在授粉後第 110 天的硬度為 25 N 及「雪蜜」在授粉後第 110 天果實硬度為 40 N；果實硬度以「台農 13 號」果實硬度最低，「台農 9 號」硬度最高，而「台農 12 號」與「雪蜜」果實硬度接近。在果皮厚度的觀察方面 (圖 3D)，在授粉後第 80 天時，「台農 9 號」果皮厚度為 71.8 μm，「台農 12 號」果皮厚度為 133.4 μm，「台農 13 號」果皮厚度為 123.1 μm 及「雪蜜」果皮厚度為 123.1 μm，各品種皆隨成熟度增加而果皮厚度增加；在採收適期觀察果皮厚度而言，「台農 9 號」在授粉後第 130 天為 246.2 μm，「台農 12 號」在授粉後第 130 天為 236 μm，「台農 13 號」授粉後第 110 天為 205.2 μm 及對照組「雪蜜」在授粉後第 110 天為 348.8 μm；果皮厚度各試驗品種隨生長發育時期增加而增加，最後果實成熟時仍以「台農 13 號」的果皮厚度較其他品種為厚，「雪蜜」品種為最薄。

果實生育過程中果皮顏色變化

在果皮亮度方面 (圖 4A)，為授粉後 40–80 d 果皮亮度由 40.13 上升至 45.32，80–90 d 略為下降至 44，後 100–130 d 上升至 57.91，以「台農 13 號」的果皮在發育各時期為各品種最亮。圖 4B 為授粉後 40–80 d 果皮之色彩濃度讀值 38.89 上升至 41.28，授粉後 80–90 d 讀值下降至 39.32，90–120 d 讀值上升至 43.22，120–130 d 讀值下降至 34.59，各試驗品種及對照組都於 130 d 時急遽下降。色相角度方面如圖 4C，色相角度 θ 值愈大則表示果皮色澤愈濃綠，各品種色相角度在授粉後第 50–70 天為一次由 107.8 上升至 112.89，70–90 d 下降至 106.6，90–100 d 開始第二次上升至 112.31，100–130 d 下降至 97.51；品種差異上以「台農 13 號」色相角度曲線變化最小，較為平緩，代表其果皮顏色變化在果實發育各階段變化較其他品種少。

果實貯運特性

貯藏期間腐損率

1. 在 20℃溫度貯藏期間腐損率 (表 1)，以各成熟度看「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」及「金桃」差異而言，「台農 13 號」品種在 6–9 分熟的表現與對照品種「金桃」表現相當，僅 9 分熟時 20℃貯運下第 6 天開始出現腐損；其餘品種熟度愈高愈快發生腐損情形，「台農 9 號」及「雪蜜」品種 9 分熟高熟度於 20℃貯運下腐損分別第 2 天及第 4 天發生。
2. 在 5℃溫度貯藏期間腐損率 (表 2)，各品種於貯藏後 10 d 皆無腐損情形，以各成熟度看各品種差異而言，「台農 12 號」、「台農 13 號」品種在 6–9 分熟的表現與對照品種「金桃」表現相當較少的腐損發生，「台農 13 號」與對照品種「金桃」有較為近似的耐貯運表現於貯藏 5℃、20 d 期間皆 0 腐損；「台農 9 號」品種 9 分熟於 5℃貯運下腐損於第 14 天後開始發生，相較其他品種早。

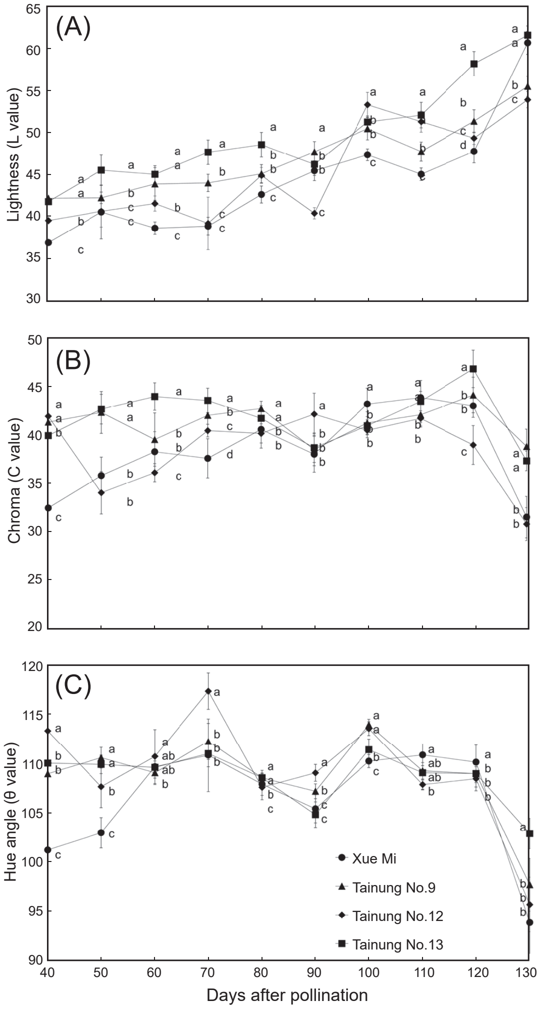

圖 4. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」之果實生育期間果皮 (A) 亮度、(B) 色彩濃度和 (C) 色相角度之變化情形。

Fig. 4. Changes of peel coloration in (A) lightness, (B) chroma and (C) hue angle of ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’ and ‘Xue Mi’ jujube during fruit growth and development. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

3. 在 1℃溫度貯藏期間腐損率 (表 3)，「台農 13 號」品種在 1℃貯藏下 6 分熟貯藏 8 d 與「金桃」腐損率相當，超過 12 d 後「台農 13 號」在 6–9 分熟都超過 25% 的腐損率，因此腐損率較對照組「金桃」嚴重，但仍比「台農 9 號」、「台農 12 號」、「雪蜜」表現為佳。

貯藏期間果皮生理障礙及寒害表現

1. 在 20℃貯藏期間生理障礙率 (表 4)，各品種各成熟度除「金桃」外可以 4 d 以上無明顯果皮生理障礙，隨成熟度增加其果皮生理障礙率較不明顯，如 8 分熟及 9 分熟較 6 分熟及 7 分熟不容易有果皮生理障礙，「台農 9 號」在 20℃貯藏期間最不容易果皮生理障礙。
2. 在 5℃溫度貯藏期間的寒害指數 (表 5)，其果皮寒害表現各試驗品種於貯藏 8 d 內皆無寒害，各品種表現差異大；以「台農 13 號」在 6–9 分熟可以連續 20 d 外觀無明顯寒害，對照品種「金桃」於 6 分熟及 7 分熟可連續 20 d，8 分熟 14 d，9 分熟 12 d；對照品種「雪蜜」則是 6 分熟及 9 分熟 8 d，7 分熟及 8 分熟可以到 16 d；「台農 12 號」則各成熟度皆 10 d。
3. 在 1℃溫度貯藏期間的寒害指數 (表 6)，各品種於低成熟度其 1℃檢疫條件果皮寒害情形較為輕微，在 1℃檢疫條件下各品種都有程度不一的果皮寒害，以品種特性來看，「台農 9 號」各成熟度皆非常不耐 1℃檢疫條件，「台農 12 號」各成熟度有嚴重的寒害，「雪蜜」8 及 9 分成熟度不耐 1℃檢疫條件，「金桃」品種各成熟度皆有輕微的寒害；「台農 13 號」在 6–8 分熟在 6 d 內果皮寒害輕微，是各品種不同成熟度中較佳的。

貯運期間總可溶性固形物變化

大致上「台農 9 號」、「台農 12 號」及對照組「雪蜜」及「金桃」在 6–9 分熟及 20、5、1℃貯藏期間，其總可溶性固形物會下降；惟在品種特性上，「台農 13 號」較不一樣，6 分熟及 7 分熟在 20℃、5℃及 6 分熟 1℃及貯運下總可溶性固形物在貯藏 10 d 後會略高，像是「台農 13 號」6 分熟在 20℃貯藏 10 d 總可溶性固形物由 7.76°Brix 上升到 9.45°Brix，6 分熟在 5℃貯藏 10 d 總可溶性固形物由 7.76°Brix 上升到 9.36°Brix。另外，對照組「雪蜜」在 5℃貯運下 6、8 及 9 分熟總可溶性固形物會於第 10 天略升後再下降，對照組「金桃」在 5℃貯運下各成熟度則會下降後上升起伏 (如表 7)。

表 1. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 20℃貯藏期間之腐損率。

Table 1. Fruit decay of jujube 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13', 'Xue Mi' and 'Jin Tao' during storage at 20℃.

		Decay (%)								
Maturity	Varieties	0[z]	2	4	6	8	10	12	14	16
Six-tenth	Tainung No. 9	0 A[y]	0 A	0 A	0 A	0 a[x]A	0 aA	5.0 ± 5.0[w] bA	10.0 ± 10.0 aB	85.0 ± 8.6 bC
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	-[v]	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 A	0 A	5.0 ± 5.0 bB	15.0 ± 6.6 cC	25.0 ± 5.0 cD	35.0 ± 5.0 bE	40.0 ± 8.2 aF
	Jin Tao	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	10.0 ± 5.8 bB	-	-	-
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 abB	10.0 ± 5.8 aC	30.0 ± 5.8 aD	45.0 ± 12.6 aE	90.0 ± 5.8 aF
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	50.0 ± 12.9 bB	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	10.0 ± 10.0 aB	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 aA	0 aA	15.0 ± 15.0 bB	25.0 ± 12.6 cC	30.0 ± 17.3 aC	50.0 ± 12.9 aD	-
	Jin Tao	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	10.0 ± 5.8 aB	-	-	-
Eight-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aB	20.0 ± 8.2 aC	85.0 ± 9.6 aD
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	10.0 ± 10.0 bB	25.0 ± 9.6 cC	40.0 ± 8.2 cC	85.0 ± 5.0 cD	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aB	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	15.0 ± 5.0 bC	45.0 ± 5.0 cD	55.0 ± 5.0 cE	-	-
	Jin Tao	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	10.0 ± 5.8 bB	15.0 ± 9.6 bC	35.0 ± 15.0 bD	-
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 A	25.0 ± 5.0 bB	25.0 ± 5.0 aB	35.0 ± 9.6 aC	35.0 ± 9.6 aD	40.0 ± 8.2 bF	45.0 ± 9.6 cG	50.0 ± 5.8 aH	100.0 ± 0.0 aI
	Tainung No. 12	0 A	0 aA	0 bA	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 dB	35.0 ± 9.6 bC	100.0 ± 0.0 aD	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 aA	0 bA	10.0 ± 10.0 bB	10.0 ± 10.0 cdB	15.0 ± 9.6 cB	40.0 ± 8.2 cC	70.0 ± 10.0 bD	-
	Xue Mi	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 cA	5.0 ± 5.0 bA	20.0 ± 14.1 bcB	45.0 ± 5.0 aC	95.0 ± 5.0 aD	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	0 bA	15.0 ± 5.0 bB	25.0 ± 9.6 abC	55.0 ± 5.0 aD	75.0 ± 9.6 bE	90 ± 5.8 cF	-

[z] Days after storage.

[y] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

[x] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.

[w] Mean ± standard error ($n = 4$).

[v] End of test.

表 2.　棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 5℃貯藏期間之腐損率。

Table 2.　Fruit decay of jujube ‘TN 9’,‘TN 12’, ‘TN 13’, ‘Xue Mi’ and ‘Jin Tao’ during storage at 5℃.

		Decay (%)					
Maturity	Varieites	12[z]	14	16	18	20	22
Six-tenth	Tainung No. 9	0 A[y]	0 A	0 A	10.0 ± 10.0[x] b[w]B	35.0 ± 15.0 bC	40.0 ± 18.3 bD
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0 A	0 A	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aB	5.0 ± 5.0 aB
	Jin Tao	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	0 A	10.0 ± 10.0 bB	35.0 ± 5.0 cC	40.0 ± 8.2 cD
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aA
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0 A	0 A	0 A	0 aA	25.0 ± 12.6 bB	25.0 ± 12.6 bB
	Jin Tao	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
Eight-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	40.0 ± 14.1 bB	55.0 ± 9.6 bC	-	-
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	20.0 ± 8.2 bB
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Jin Tao	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 aA	15.0 ± 5.0 cB	30.0 ± 5.7 cC	70.0 ± 5.8 cD	100.0 ± 0.0 dE	-
	Tainung No. 12	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	10.0 ± 5.8 aB
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	20.0 ± 0.0 cB	45.0 ± 5.0 bC
	Xue Mi	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	70.0 ± 5.8 cB
	Jin Tao	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 aB

表 2. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 5℃貯藏期間之腐損率。(續)

Table 2. Fruit decay of jujube ‘TN 9’,‘TN 12’, ‘TN 13’, ‘Xue Mi’ and ‘Jin Tao’ during storage at 5℃. (continued)

Maturity	Varieites	Decay (%)					
		24	26	28	30	32	34
Six-tenth	Tainung No. 9	60.0 ± 14.1 cE	-[v]	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	5.0 ± 5.0 bB	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	15.0 ± 5.0 bB	-
	Xue Mi	20.0 ± 8.2 bC	30.0 ± 17.3 cD	45.0 ± 12.6 cE	55.0 ± 9.6 cF	-	-
	Jin Tao	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	15.0 ± 9.6 B
Seven-tenth	Tainung No. 9	80.0 ± 8.2 cE	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	10.0 ± 5.8 bB	20.0 ± 11.5 cC	25.0 ± 15.0 bC	55.0 ± 17.1 bD	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	10.0 ± 10.0 bB	10.0 ± 10.0 aB	10.0 ± 10.0 aB	-	-
	Xue Mi	60.0 ± 14.1 bC	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 A	10.0 ± 5.8 A
Eight-tenth	Tainung No. 9	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	20.0 ± 8.2 aB	35.0 ± 12.6 cC	50.0 ± 12.9 bD	-	-	-
	Tainung No. 13	45.0 ± 9.6 bB	45.0 ± 9.6 cB	45.0 ± 9.6 bB	45.0 ± 9.6 aB	-	-
	Xue Mi	55.0 ± 17.1 cB	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	40.0 ± 14.1 aB	-	-
Nine-tenth	Tainung No. 9	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	15.0 ± 5.0 aC	25.0 ± 5.0 bD	-	-	-	-
	Tainung No. 13	50.0 ± 5.8 bD	65.0 ± 5.0 cE	-	-	-	-
	Xue Mi	-	-	-	-	-	-
	Jin Tao	10.0 ± 10.0 aB	15.0 ± 15.0 aC	25.0 ± 12.6 C	65.0 ± 20.6 D	-	-

[z] Days after storage.
[y] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.
[x] Mean ± standard error ($n = 4$).
[w] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.
[v] End of test.

表 3. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 1℃貯藏期間之腐損率。

Table 3. Fruit decay of jujube ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’, ‘Xue Mi’ and ‘Jin Tao’ during storage at 1℃.

Maturity	Varieites	Decay (%)							
		0[z]	2	4	6	8	10	12	14
Six-tenth	Tainung No. 9	0 A[y]	10.0 ± 10.0[x] b[w]B	10.0 ± 10.0 bB	90.0 ± 10.0 cC	-[v]	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	40.0 ±14.1 bB	40.0 ± 14.1 bB	90.0 ± 5.8 cC	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aB	5.0 ± 5.0 aB	10.0 ± 5.8 bC	25.0 ± 9.6 bD	-
	Xue Mi	0 A	40.0 ± 8.2 cB	40.0 ± 8.2 cB	50.0 ± 10.0 bC	50.0 ± 10.0 bC	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	30.0 ± 13.0 aB	60.0 ± 16.0 C
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 A	35.0 ± 17.0 bB	40.0 ± 16.3 cB	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	0 aA	10.0 ± 5.8 aB	-	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	5.0 ± 5.0 aA	5.0 ± 5.0 aA	15.0 ± 9.6 bB	60.0 ± 14.0 cC	-	-	-
	Xue Mi	0 A	10.0 ± 5.8 aB	20.0 ± 8.2 bC	45.0 ± 9.6 cD	45.0 ± 9.6 bD	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	20.0 ± 8.2 A	45.0 ± 22.0 B	70.0 ± 13.0 C
Eight-tenth	Tainung No .9	0 A	65.0 ± 15.0 dB	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	15.0 ± 5.0 bB	75.0 ± 15.0 cC	-	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	15.0 ± 5.0 bB	25.0 ± 5.0 bC	35.0 ± 9.6 bD	55.0 ± 9.6 bE	-	-	-
	Xue Mi	0 A	35.0 ± 9.6 cB	70.0 ± 10.0 cC	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aA	5.0 ± 5.0 aA	5.0 ± 5.0 aA	50.0 ± 13.0 B	75.0 ± 13.0 C	
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 A	100.0 ± 0.0 cB	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	5.0 ± 5.0 bB	70.0 ± 5.8 bC	-	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	5.0 ± 5.0 bB	100.0 ± 0.0 cC	-	-	-	-	-
	Xue Mi	0 A	100.0 ± 0.0 cB	-	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 aA	5.0 ± 5.0 aB	85.0 ± 5.0 C	-	-	-	-

[z] Days after storage.
[y] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.
[x] Mean ± standard error ($n = 4$).
[w] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.
[v] End of test.

表 4. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 20℃貯藏期間果皮之生理障礙率。

Table 4. Physiological disorder on fruit peels of jujube 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13', 'Xue Mi' and 'Jin Tao' during storage at 20℃.

		Physiological disorders (index %)								
Maturity	Varieites	0[z]	2	4	6	8	10	12	14	16
Six-tenth	Tainung No. 9	0 A[y]	0 A	0 a[x]A	0 aA	0 aA	0 aA	0.10 ± 0.10[w] aB	0.10 ± 0.10 aB	0.10 ± 0.10 aB
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	0 aA	2.55 ± 0.48 cB	3.20 ± 0.37 dC	3.65 ± 0.35 cD	-[v]	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	1.45 ± 0.30 bB	1.50 ± 0.70 bB	2.40 ± 0.76 cC	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 aA	0.59 ± 0.42 cB	0.59 ± 0.42 aB	1.00 ± 0.42 bC	1.21 ± 0.46 bC	2.25 ± 0.16 bD	2.58 ± 0.28 bE
	Jin Tao	0 A	0 A	0.65 ± 0.62 bB	0.70 ± 0.42 bB	3.45 ± 0.38 dC	3.69 ± 0.31 dD	-	-	-
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 A
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	0 aA	2.50 ± 0.37 cB	3.35 ± 0.17 dC	3.79 ± 0.13 cD	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	1.00 ± 0.29 bB	2.35 ± 0.33 cB	2.53 ± 0.74 cC	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 aA	0.25 ± 0.13 aA	1.16 ± 0.34 bB	1.16 ± 0.34 bB	1.66 ± 0.80 bC	1.66 ± 0.10 bC	-
	Jin Tao	0 A	0 A	0.75 ± 0.54 bA	1.05 ± 0.30 bA	3.45 ± 0.05 dB	3.50 ± 0.11 dB	-	-	-
Eight-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 A	0 A
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0.25 ± 0.25 aB	0.43 ± 0.43 bC	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 aA	0.95 ± 0.46 bB	1.80 ± 0.27 cC	3.75 ± 0.25 dD	3.75 ± 0.35 cC	-	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 aA	0 aA	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 A	0 A	0.25 ± 0.22 bB	0.30 ± 0.13 aB	1.05 ± 0.42 bC	1.11 ± 0.40 cC	1.78 ± 0.48 bD	-	-
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 A	0 A	0 A
	Tainung No. 12	0 A	0 A	0 A	0 A	0.60 ± 0.24 bB	1.58 ± 0.25 bC	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 A	0 A	-
	Xue Mi	0 A	0 A	0 A	0 A	0 aA	0 aA	0 A	-	-
	Jin Tao	0 A	0 A	0 A	0 A	-	-	-	-	-

[z] Days after storage.

[y] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.

[x] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.

[w] Mean ± standard error ($n = 4$).

[v] End of test.

表 5. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 5℃貯藏期間果皮之寒害率。

Table 5. Chilling injury on fruit peels of jujube 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13', 'Xue Mi' and 'Jin Tao' during storage at 5℃.

		Chilling injury index				
Maturity	Varieites	10[z]	12	14	16	18
Six-tenth	Tainung No. 9	0 a[y]A[x]	0 aA	0.05 ± 0.05[w] aB	0.05 ± 0.05 aB	0.05 ± 0.05 aB
	Tainung No. 12	0 aA	0.55 ± 0.19 cA	0.55 ± 0.19 cA	0.55 ± 0.06 bA	0.75 ± 0.24 cB
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0.15 ± 0.15 bB	0.20 ± 0.14 bB	0.25 ± 0.13 bB	0.45 ± 0.13 cC	0.45 ± 0.13 bC
	Jin Tao	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Tainung No. 12	0 A	0.10 ± 0.10 bA	0.10 ± 0.10 aA	0.15 ± 0.15 bB	0.15 ± 0.15 bB
	Tainung No. 13	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0.05 ± 0.05 aA
	Jin Tao	0 A	0 aA	0 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.30 ± 0.10 cA
Eight-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Tainung No. 12	0 A	0.60 ± 0.20 bA	0.60 ± 0.20 bA	0.70 ± 0.19 bB	0.70 ± 0.18 cB
	Tainung No. 13	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0 A	0 aA	0 aA	0 aA	0.10 ± 0.06 aA
	Jin Tao	0 A	0 aA	0 aA	0.15 ± 0.10 aB	0.40 ± 0.08 bC
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 aA	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
	Tainung No. 12	0 aA	0.25 ± 0.10 B	0.25 ± 0.10 cB	0.45 ± 0.13 cC	0.45 ± 0.13 cC
	Tainung No. 13	0 aA	0 A	0 aA	0 aA	0 aA
	Xue Mi	0.05 ± 0.05 bA	0.15 ± 0.10 B	0.15 ± 0.10 bB	0.15 ± 0.10 bB	0.20 ± 0.08 bB
	Jin Tao	0 aA	0 A	0.10 ± 0.10 bA	0.10 ± 0.10 aA	0.35 ± 0.24 bcB

		Chilling injury index				
Maturity	Varieites	20	22	24	26	28
Six-tenth	Tainung No. 9	0.06 ± 0.06 aB	0.27 ± 0.10 aC	-[v]	-	-
	Tainung No. 12	1.70 ± 0.10 bC	2.05 ± 0.22 dD	2.25 ± 0.15 dE	3.11 ± 0.13 dF	3.11 ± 0.13dG
	Tainung No. 13	0 aA	1.25 ± 0.30 cB	1.40 ± 0.29 cB	2.00 ± 0.35 bC	2.60 ± 0.32 cD
	Xue Mi	0.51 ± 0.12 aC	0.56 ± 0.16 bC	1.11 ± 0.21 bD	2.15 ± 0.49 cE	2.15 ± 0.49 bE
	Jin Tao	0 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.70 ± 0.17 aB	1.10 ± 0.10 aB	1.70 ± 0.38 aC
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 aA	0.15 ± 0.15 aB	-	-	-
	Tainung No. 12	0.20 ± 0.20 bC	0.92 ± 0.22 cC	1.35 ± 0.28 aD	1.90 ± 0.10 bE	1.90 ± 0.10 bE
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	1.35 ± 0.34 aB	1.35 ± 0.15 aB	1.40 ± 0.41 aB
	Xue Mi	0.33 ± 0.08 bB	0.43 ± 0.08 bC	-	-	-
	Jin Tao	0.50 ± 0.10 cA	1.00 ± 0.26 cB	1.40 ± 0.14 aB	2.20 ± 0.14 cC	2.75 ± 0.22 cC
Eight-tenth	Tainung No. 9	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0.60 ± 0.26 dC	1.46 ± 0.48 cC	1.69 ± 0.48 cD	2.27 ± 0.54 cE	2.27 ± 0.54 bE
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0.56 ± 0.21 aB	0.56 ± 0.21 aB	1.16 ± 0.50 aC
	Xue Mi	0.20 ± 0.08 bA	1.46 ± 0.48 cB	-	-	-

表 5. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」之果實於 5℃貯藏期間果皮之寒害率。(續)

Table 5. Chilling injury on fruit peels of jujube 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13', 'Xue Mi' and 'Jin Tao' during storage at 5℃. (continued)

Maturity	Varieites	Chilling injury index				
		20	22	24	26	28
	Jin Tao	0.40 ± 0.08 cC	0.80 ± 0.08 bD	1.15 ± 0.10 bE	1.65 ± 0.40 bF	2.29 ± 0.28 bG
Nine-tenth	Tainung No. 9	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	1.39 ± 0.49 dC	2.45 ± 0.22 bE	2.45 ± 0.19 bE	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	-	-	-	-
	Xue Mi	0.58 ± 0.21 cC	0.58 ± 0.21 aC	-	-	-
	Jin Tao	0.40 ± 0.22 bB	0.50 ± 0.17 aC	1.27 ± 0.22 aC	1.45 ± 0.21 D	2.19 ± 0.28 E

[z] Days after storage.
[y] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.
[x] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.
[w] Mean ± standard error ($n = 4$).
[v] End of test.

貯運期間可滴定酸含量變化

「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「雪蜜」及「金桃」在 6–9 分熟及 20、5、1℃貯藏期間，可滴定酸會隨貯藏期間增加而降低；比較特別的是在 7 分熟下貯藏溫度 20℃時，「台農 12 號」、「台農 13 號」、「雪蜜」及「金桃」貯藏 10 d 其可滴定酸略微增加，像是「台農 13 號」會由 0.22 上升至 0.25。在貯藏溫度 5℃下時「台農 13 號」在 7 分熟貯藏 30 d 可滴定酸含量由 0.22 增加至 0.27，「雪蜜」與「金桃」於 5℃在 6 分熟及 7 分熟貯藏 30 d 間可滴定酸含量呈現上下波動，像「雪蜜」5℃在 6 分熟及貯藏 10 d 由 0.25 到 0.27，20 d 再降至 0.25；8 分及 9 分熟則隨貯藏時間增加而減少可滴定酸含量。以品種觀點，「台農 13 號」在 20℃、5℃貯運，但 6–8 分熟可滴定酸含量隨貯運略微增加，與其他品種反應下降的表現較為不同 (如表 8)。

討論

本試驗研究調查棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」果實生長發育方面，70–90 d 在果長、果寬、鮮重快速生長，100 d 後開始進入快速成熟，台農系列棗果實生長發育期間，果實縱徑、果實橫徑及鮮重變化均呈雙 S 型，惟在不同品種果實發育生理在發育速率快慢、二氧化碳釋放量及乙烯釋放量及生成時期有顯著差異，結果各品種之前人研究「台農 1 號」(Chang 1999)、「新蜜棗」(Tsai 2004)、「蜜棗」及「高朗 3 號」(Chen 2005) 品種在果實生長發育結果近似都呈雙 S 型，有別於像是木瓜大部分品種是單 S 型，有些品種為雙 S 型的特色 (Tsai & Ke 2004) 的特性。其中以「台農 13 號」果實生長速率較其他台農系列品種快，於開花後 100 d 可達果實最大體積與重量及總可溶性固形物含量於授粉後 100 d 可達 10°Brix 以上 (如圖 1)，其他「台農 9 號」、「台農 12 號」棗品種授粉後 130 d 後達到最大重量。

在不同棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」品種之果實生育期間果實果皮亮度 (L^* value) 、色彩濃度 (C^* value) 及色相角度 (θ value) 方面的數值觀測上 (如圖 4)；整體而言，果皮亮度隨果實生育增加而數值由最低的 35 上升到 61，各品種如「雪蜜」在讀值 45 以上屬接近 8 分熟，而「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」等 3 個品種則在讀值 50 以上才接近

表 **6.** 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」果實於 1℃貯藏期間果皮之寒害率。

Table 6. Chilling injury on fruit peels of jujube 'TN 9', 'TN 12', 'TN 13', 'Xue Mi' and 'Jin Tao' during storage at 1℃.

Maturity	Varieites	Chilling injury (index %)							
		0[z]	2	4	6	8	10	12	14
Six-tenth	Tainung No. 9	0 a[y]A[x]	1.60 ± 0.40[w] bB	2.27 ± 0.24 bC	-[v]	-	-	-	-
	Tainung No. 12	1.65 ± 0.39 bB	2.45 ± 0.31 cC	2.45 ± 0.26 bC	2.46 ± 0.39 bC	2.54 ± 0.36 cC	2.54 ± 0.36 cC	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	-
	Xue Mi	0 aA	0 aA	0 aA	0.20 ± 0.14 aB	0.30 ± 0.20 bB	0.30 ± 0.20 bB	-	-
	Jin Tao	0 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 bA	0.10 ± 0.10 A
Seven-tenth	Tainung No. 9	0 aA	2.00 ± 0.40 cB	2.76 ± 0.48 bC	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	1.55 ± 0.21 bB	3.25 ± 0.25 dC	3.65 ± 0.24 dD	-	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0.10 ± 0.10 aA	0.10 ± 0.10 aA	1.00 ± 0.50 aB	1.00 ± 0.50 aB	-	-
	Xue Mi	0 aA	0.60 ± 0.40 bB	1.10 ± 0.40 cC	1.46 ± 0.43 cD	1.46 ± 0.60 aD	1.46 ± 0.60 aD	-	-
	Jin Tao	0 aA	0.50 ± 0.20 bB	0.60 ± 0.20 bB	0.60 ± 0.14 bB	1.00 ± 0.20 aC	1.10 ± 0.20 aD	1.10 ± 0.30 D	1.20 ± 0.50 E
Eight-tenth	Tainung No. 9	0 aA	0.10 ± 0.10 aB	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0.15 ± 0.15 bB	0.90 ± 0.38 cC	1.36 ± 0.49 cD	1.50 ± 0.96 bD	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0.50 ± 0.30 aB	0.50 ± 0.30 aB	-	-
	Xue Mi	0.10 ± 0.10 aA	1.70 ± 0.20 dB	1.80 ± 0.80 dB	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 aA	0.50 ± 0.10 bB	0.60 ± 0.20 bB	0.76 ± 0.23 bB	1.10 ± 0.20 bC	1.10 ± 0.20 bC	1.50 ± 0.90 D	-
Nine-tenth	Tainung No. 9	0 A	0 aA	-	-	-	-	-	-
	Tainung No. 12	0 A	0.23 ± 0.10 bA	0.63 ± 0.47 bB	-	-	-	-	-
	Tainung No. 13	0 A	0.30 ± 0.30 bB	0.30 ± 0.30 aB	-	-	-	-	-
	Xue Mi	0 A	0 aA	-	-	-	-	-	-
	Jin Tao	0 A	1.20 ± 0.20 cB	1.90 ± 0.20 cC	2.10 ± 0.20 D	2.30 ± 0.30 E	-	-	-

[z] Days after storage.
[y] Means separation within column (small letter) of same production time with different varieties. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.
[x] Means separation within column (capital letter) of same varieties with different production time. Different letters following the value represent significant difference according to *t*-test at $P \leq 0.05$.
[w] Mean ± standard error ($n = 4$).
[v] End of test.

表 7. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」不同成熟度果實貯藏於 20、5 及 1℃對於總可溶性固形物之影響。

Table 7. Effect of different fruit maturity of jujube varieties ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’, ‘Xue Mi’ and ‘Jin Tao’ on total soluble solids (°Brix) during storage at 20, 5 and 1℃.

Varieites	Maturity	20[z]		5				1	
		0[y]	10	0	10	20	30	0	10
Tainung No. 9	Six-tenth	11.65 ± 0.67[x] a[w]	11.64 ± 0.84 a	11.65 ± 0.67 a	10.98 ± 0.53 a	10.06 ± 0.72 a	-[v]	11.65 ± 0.67 a	9.68 ± 0.60 a
	Seven-tenth	13.38 ± 0.72 b	11.78 ± 0.74 a	13.38 ± 0.72 b	13.28 ± 0.82 b	10.96 ± 0.80 a	-	13.38 ± 0.72 b	11.65 ± 1.15 b
	Eight-tenth	14.66 ± 0.77 c	13.56 ± 0.93 b	14.66 ± 0.77 c	11.46 ± 0.71 a	10.80 ± 0.74 a	-	14.66 ± 0.77 c	11.40 ± 0.54 b
	Nine-tenth	15.36 ± 1.24 c	-	15.36 ± 1.24 c	13.31 ± 0.75 b	10.31 ± 0.53 a	-	15.36 ± 1.24 c	13.68 ± 0.83 c
Tainung No. 12	Six-tenth	10.64 ± 0.67 a	7.03 ± 0.60 a	10.64 ± 0.67 a	9.26 ± 0.47 a	8.73 ± 0.69 a	10.06 ± 0.62 a	10.64 ± 0.67 a	9.70 ± 0.51 b
	Seven-tenth	11.06 ± 0.70 a	7.65 ± 0.35 a	11.06 ± 0.70 a	11.04 ± 0.23 b	9.44 ± 0.45 b	10.10 ± 0.45 a	11.06 ± 0.70 a	7.59 ± 0.43 a
	Eight-tenth	11.73 ± 0.37 a	8.75 ± 1.07 b	11.73 ± 0.37 a	10.84 ± 0.40 b	10.09 ± 0.36 b	10.64 ± 0.50 a	11.73 ± 0.37 a	9.30 ± 0.46 b
	Nine-tenth	13.19 ± 0.80 b	11.15 ± 0.43 c	13.19 ± 0.80 b	11.28 ± 0.54 b	10.84 ± 0.63 c	-	13.19 ± 0.80 b	-
Tainung No. 13	Six-tenth	7.76 ± 0.43 a	9.45 ± 0.72 a	7.76 ± 0.43 a	9.36 ± 0.53 a	8.84 ± 0.70 a	8.44 ± 0.37 a	7.76 ± 0.43 a	8.54 ± 0.42 a
	Seven-tenth	9.25 ± 0.63 b	9.59 ± 1.16 a	9.25 ± 0.63 b	10.80 ± 0.55 b	9.59 ± 0.80 a	9.50 ± 0.73 b	9.25 ± 0.63 b	8.60 ± 0.55 a
	Eight-tenth	11.40 ± 0.82 c	9.85 ± 0.87 a	11.40 ± 0.82 c	12.39 ± 0.58 c	10.71 ± 0.66 b	-	11.40 ± 0.82 c	9.61 ± 0.59 b
	Nine-tenth	14.33 ± 0.53 d	11.83 ± 0.51 b	14.33 ± 0.53 d	12.51 ± 0.54 c	12.83 ± 0.77 c	-	14.33 ± 0.53 d	-
Xue Mi	Six-tenth	11.15 ± 0.63 a	10.80 ± 0.27 b	11.15 ± 0.63 a	11.86 ± 0.60 a	11.68 ± 0.52 ab	-	11.15 ± 0.63 a	10.81 ± 0.38 a
	Seven-tenth	11.33 ± 0.87 a	9.64 ± 0.60 a	11.33 ± 0.87 a	11.24 ± 0.66 a	10.89 ± 0.49 a	9.95 ± 0.61	11.33 ± 0.87 a	12.56 ± 0.83 b
	Eight-tenth	11.95 ± 0.60 b	10.31 ± 0.57 a	11.95 ± 0.60 b	12.89 ± 0.53 b	11.24 ± 0.53 a	-	11.95 ± 0.60 b	10.31 ± 0.86 a
	Nine-tenth	13.49 ± 0.39 c	-	13.49 ± 0.39 c	14.54 ± 0.92 c	12.71 ± 0.60 c	-	13.49 ± 0.39 c	-
Jin Tao	Six-tenth	8.38 ± 0.31 a	5.24 ± 0.30 a	8.38 ± 0.31 a	6.34 ± 0.24 a	8.14 ± 0.50 a	7.55 ± 0.61 a	8.38 ± 0.31 a	7.59 ± 0.24 a
	Seven-tenth	8.38 ± 0.45 a	6.36 ± 0.38 b	8.36 ± 0.45 a	7.39 ± 0.35 b	7.80 ± 0.29 a	8.45 ± 0.60 b	8.36 ± 0.45 a	8.21 ± 0.52 a
	Eight-tenth	10.49 ± 0.43 b	8.64 ± 0.61 c	10.49 ± 0.43 b	8.34 ± 0.59 c	9.31 ± 0.44 b	9.58 ± 0.41 c	10.49 ± 0.43 b	9.75 ± 0.60 b
	Nine-tenth	11.74 ± 0.51 c	-	11.74 ± 0.51 c	9.10 ± 0.41 c	10.50 ± 0.55 c	10.74 ± 0.30 d	11.74 ± 0.51 c	9.89 ± 0.47 b

[z] Storage temperature.
[y] Days after storage.
[x] Mean ± standard error ($n = 4$).
[w] Different letters following the value represent significant difference according to t-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from December 1, 2018 to March 31, 2019.
[v] End of test.

表 8. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」及對照組「金桃」、「雪蜜」不同成熟度果實貯藏於 20、5 及 1℃對於可滴定酸之影響。

Table 8. Effect of different fruit maturity of jujube varieties ‘TN 9’, ‘TN 12’, ‘TN 13’, ‘Xue Mi’ and ‘Jin Tao’ on titratible acid content (%) during storage at 20, 5 and 1℃.

		20[z]		5				1	
Varieites	Maturity	0[y]	10	0	10	20	30	0	10
Tainung No. 9	Six-tenth	0.260 ± 0.031[x] a[w]	0.290 ± 0.041 a	0.260 ± 0.031 a	0.230 ± 0.026 a	0.230 ± 0.017 b	-[v]	0.260 ± 0.031 a	0.220 ± 0.017 a
	Seven-tenth	0.320 ± 0.068 b	0.280 ± 0.015 a	0.320 ± 0.068 b	0.230 ± 0.026 a	0.200 ± 0.004 a	-	0.320 ± 0.068 b	0.220 ± 0.019 a
	Eight-tenth	0.240 ± 0.010 a	0.260 ± 0.015 a	0.240 ± 0.010 a	0.220 ± 0.006 a	0.210 ± 0.014 ab	-	0.240 ± 0.010 a	0.210 ± 0.020 a
	Nine-tenth	0.260 ± 0.034 a	-	0.260 ± 0.034 a	0.240 ± 0.014 a	0.190 ± 0.009 a	-	0.260 ± 0.034 a	0.230 ± 0.010 a
Tainung No. 12	Six-tenth	0.200 ± 0.035 a	0.220 ± 0.005 a	0.200 ± 0.035 a	0.200 ± 0.015 a	0.200 ± 0.018 a	0.220 ± 0.024 b	0.200 ± 0.035 a	0.170 ± 0.013 b
	Seven-tenth	0.210 ± 0.011 a	0.230 ± 0.029 a	0.210 ± 0.011 a	0.200 ± 0.017 a	0.190 ± 0.011 a	0.190 ± 0.009 a	0.210 ± 0.011 a	0.160 ± 0.008 a
	Eight-tenth	0.240 ± 0.034 b	0.210 ± 0.006 a	0.210 ± 0.034 b	0.200 ± 0.018 a	0.200 ± 0.016 a	0.210 ± 0.017 a	0.240 ± 0.034 b	0.150 ± 0.006 a
	Nine-tenth	0.220 ± 0.026 a	0.220 ± 0.008 a	0.220 ± 0.026 a	0.190 ± 0.011 a	0.210 ± 0.080 a	-	0.220 ± 0.026 a	-
Tainung No. 13	Six-tenth	0.220 ± 0.126 a	0.300 ± 0.015 b	0.220 ± 0.126 a	0.260 ± 0.012 a	0.220 ± 0.049 a	0.250 ± 0.025 a	0.220 ± 0.126 a	0.210 ± 0.027 b
	Seven-tenth	0.220 ± 0.069 a	0.250 ± 0.024 a	0.220 ± 0.069 a	0.250 ± 0.030 b	0.270 ± 0.015 b	0.270 ± 0.024 a	0.220 ± 0.069 a	0.220 ± 0.021 a
	Eight-tenth	0.250 ± 0.010 b	0.250 ± 0.019 a	0.250 ± 0.010 b	0.220 ± 0.011 a	0.260 ± 0.027 ab	-	0.250 ± 0.010 b	0.220 ± 0.009 a
	Nine-tenth	0.310 ± 0.014 b	0.290 ± 0.024 b	0.310 ± 0.014 b	0.280 ± 0.013 a	0.200 ± 0.015 a	-	0.310 ± 0.014 b	-
Xue Mi	Six-tenth	0.250 ± 0.016 a	0.240 ± 0.010 a	0.250 ± 0.016 a	0.270 ± 0.021 a	0.250 ± 0.026 a	-	0.250 ± 0.016 a	0.220 ± 0.019 a
	Seven-tenth	0.240 ± 0.016 a	0.290 ± 0.013 b	0.240 ± 0.016 a	0.230 ± 0.005 b	0.240 ± 0.023 b	0.220 ± 0.022	0.240 ± 0.016 a	0.200 ± 0.015 a
	Eight-tenth	0.280 ± 0.008 b	0.230 ± 0.009 a	0.280 ± 0.008 b	0.240 ± 0.013a	0.230 ± 0.018 ab	-	0.280 ± 0.008 b	0.190 ± 0.018 a
	Nine-tenth	0.280 ± 0.014 b	-	0.280 ± 0.014 b	0.220 ± 0.011a	0.250 ± 0.022 a	-	0.280 ± 0.014 b	-
Jin Tao	Six-tenth	0.180 ± 0.030 a	0.140 ± 0.004 a	0.180 ± 0.030 a	0.160 ± 0.016 a	0.170 ± 0.040 b	0.170 ± 0.024 b	0.180 ± 0.030 a	0.160 ± 0.014 a
	Seven-tenth	0.210 ± 0.030 a	0.220 ± 0.029 c	0.210 ± 0.030 a	0.150 ± 0.005 a	0.130 ± 0.008 a	0.140 ± 0.009 a	0.210 ± 0.030 a	0.180 ± 0.041 b
	Eight-tenth	0.250 ± 0.045 b	0.190 ± 0.010 b	0.250 ± 0.045 b	0.180 ± 0.007 b	0.170 ± 0.013 b	0.160 ± 0.013 b	0.250 ± 0.045 b	0.160 ± 0.011 a
	Nine-tenth	0.230 ± 0.030 b	-	0.230 ± 0.030 b	0.190 ± 0.014 b	0.130 ± 0.015 b	0.130 ± 0.008 a	0.230 ± 0.030 b	0.140 ± 0.010 a

[z] Storage temperature.
[y] Days after storage.
[x] Mean ± standard error ($n = 4$).
[w] Value followed by the same letter in each colum are not significantly different according to t-test at $P \leq 0.05$. Investigation was conducted from 1 December, 2018 to 31 March, 2019.
[v] End of test.

8 分熟；在色彩濃度方面，讀值一開始由較高的 32–43 到 8 分熟時略微下降至 30–40，「雪蜜」與「台農 13 號」約在讀值 43、「台農 9 號」約在讀值 38、「台農 12 號」約在讀值 30 接近 8 分熟之採收適期。色相角度方面，「雪蜜」和「台農 13 號」約在讀值 110、「台農 9 號」約在讀值 97、「台農 12 號」約在讀值 95 接近 8 分熟之採收適期。相關數值可做為未來無人機械採收之參考依據，亦可協助栽培農戶依市場需求判斷不同品種之不同成熟度之參考標準。

由上述「台農 9 號」、「台農 12 號」及「台農 13 號」果實生育調查結果，建議「台農 9 號」和「台農 12 號」的採收適期為授粉後 120–130 d，其果重和總可溶性固形物可以達到最高；建議「台農 9 號」採收成熟度為 7–9 分熟，「台農 12 號」採收成熟度可為 8 分熟及 9 分熟。「台農 13 號」採收適期為授粉後 100–120 d，其果重及總可溶性固形物可以達到最高，建議「台農 13 號」採收成熟度為 7–9 分熟；對照組「雪蜜」為授粉後 110–120 d，「台農 13 號」採收期較「雪蜜」長 10 d。因此，多樣的品種可以分散產期，增加採收販賣的時間。棗果實會後熟，與獼猴桃等後熟型的果實相同，其乙烯生成率是決定貯藏壽命的主要因子 (Chou *et al*. 2000)，因此，果實呼吸率與乙烯生成率及其抑制的生理研究是需要深入探討。

在調查 20、5 及 1℃的貯藏溫度對棗台農各品種貯運性的影響，棗「台農 9 號」在 5℃及 1℃貯藏期間果實腐損發生時間較早、腐損率較高，「台農 12 號」在 5℃及 1℃寒害指數上升最快，「台農 13 號」在 5℃及 1℃寒害指數表現略優對照「金桃」品種，腐損率表現在 5℃及 1℃略差於「金桃」品種，可溶性固形物在貯運期間表現優於「金桃」品種。棗之採收成熟度影響櫥架壽命及貯運期長短，成熟度也會影響果實對低溫的反應 (Pao 2012)，綜合本試驗研究結果顯示，棗台農系列品種以 7 分熟及 8 分的成熟度為採收適期，並配合 5℃為最適貯藏溫度 (如圖 5 及表 7)，「台農 12 號」、「台農 13 號」及「金桃」品種於貯藏 20 d 後之果皮外

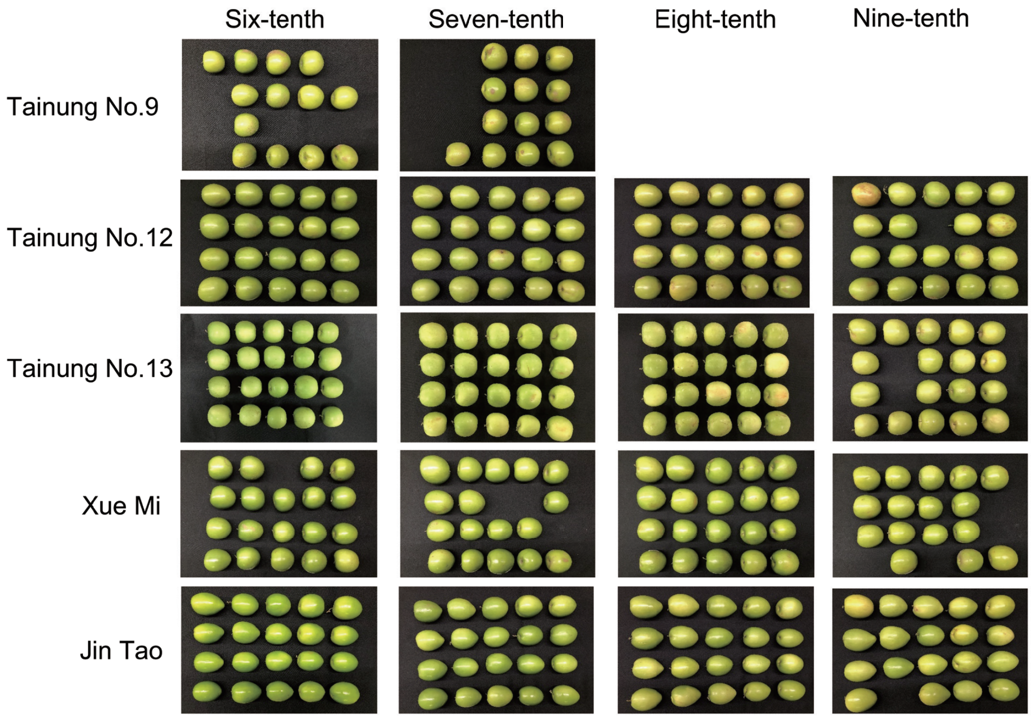

圖 5. 棗「台農 9 號」、「台農 12 號」、「台農 13 號」果實於 5℃貯藏 20 d 之外觀。

Fig. 5. Fruit appearance of jujube varieties ‘TN 9’, ‘TN 12’ and ‘TN 13’ after storage at 5℃ for 20 d.

觀無明顯劣變；因此，對於外銷貯運時間需達 14 d 以上又無需檢疫溫度處理者，建議採收 7 分熟及 8 分熟果實並以 5℃進行貯運，對於貯運時間為 5–10 d 又無需檢疫需求者，建議果實可達 8 分熟及 9 分熟；如需經檢疫低溫 1.2℃處理 2 wk 者，建議果實仍以不超過 7 分熟為最適採收期。

誌謝

本研究承科技部智慧科技於農業生產之具外銷潛力果品創新保鮮技術開發計畫 (MOST107-2321-B-) 經費補助，特此致謝。

引用文獻

Awasthi, O. P. and T. A. More. 2009. Genetic diversity and status of *Ziziphus* in India. ISHS Acta Hortic. 840:33–40. doi:10.17660/ActaHortic.2009.840.2

Chang, L. H. 1999. Studies on the Development of Indian Jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) Fruit. Master Thesis. Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 66 pp. (in Chinese with English abstract)

Chen, L. H. 2005. Studies on the physico-chemical characteristics during fruit growth and the post-harvest physiology of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) fruit. Master Thesis. Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 128 pp. (in Chinese with English abstract)

Chou, H. N., S. M. Ou, and C. C. Nee. 2000. Studies on the changes in composition of Taiwan kiwifruit during fruit storage. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 46:157–172. (in Chinese with English abstract)

Council of Agriculture. n.d. 2020 Agricultural statistics yearbook. https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2512591 (visit on 02/21/2022) (in Chinnese)

Guo, J. H., C. H. Wu, W. H. Lee, L. H. Chang, and C. C. Huang. 2020. Study on the traits of 'Tainung No. 13-Shirley' jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.). J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 66:171–180. (in Chinese with English abstract)

Lee, H. T. 2019. Effects of Salicylic Acid Treatment on Physiology and Quality of Jujube, Wax Apple and Lime Fruit after Harvest. Master Thesis. Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 173 pp. (in Chinese with English abstract)

Pao, C. W. 2012. Effects of the post-harvest treatments on quality of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) 'Mitzau' and 'Kaohsiung No. 5' fruits. Master Thesis. Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 167 pp. (in Chinese with English abstract)

Razi, M. F. D., R. Anwar, S. M. A. Basra, M. M. Khan, and I. A. Khan. 2013. Morphological characterization of leaves and fruit of jujube (*Ziziphus mauritiana* Lamk.) germplasm in Faisalabad, Pakistan. Pak. J. Agric. Sci. 50:211–216.

Saran, P. L., A. K. Godara, I. S. Yadav, S. K. Sehrawat, and G. La. 2006. Morphological diversity among Indian jujube (*Ziziphus mauritiana* Lamk.) genotypes collected at Hisar, India. J. Food Agric. Environ. 4:172–175.

Singh, A. and P. R. Meghwal. 2020. Socio-economic and horticultural potential of *Ziziphus* species in arid regions of Rajasthan India. Genet. Resour. Crop Evol. 67:1301–1313. doi:10.1007/s10722-020-00891-x

Tsai, Y. C. 2004. Studies on the growth and development and storageof Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) fruits. Master Thesis. Department of Horticulture, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 140 pp. (in Chinese with English abstract)

Tsai, Y. H. and L. S. Ke. 2004. Studies on the physico-chemical changes of papaya (*Carica papaya* L.) fruits during growth and development. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 50:63–78. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JCSHS.200403.0063

Studies on the Physico-Chemical Changes in Fruits of Jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) 'Tainung No. 9', 'Tainung No. 12' and 'Tainung No. 13' during Development and Storage

Jhan-Hong Guo[1], Min-Chi Hsu[2], Kuo-Dung Chiou[3], Wen-Li Lee[4], and Yu-Shen Liang[5,*]

Abstract

Guo, J. H., M. C. Hsu, K. D. Chiou, W. L. Lee, and Y. S. Liang. 2022. Studies on the physico-chemical changes in fruits of jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) 'Tainung No. 9', 'Tainung No. 12' and 'Tainung No. 13' during development and storage. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):209–229.

To investigate the physico-chemical changes of jujube fruit during growth and stage, the varieties of 'TN 9-New Honey King', 'TN 12-Water Honey', and 'TN 13-Shirley' were used as materials. The results showed that the fruit growth pattern appeared double the sigmoid curve on fruit fresh weight, fruit longitudinal diameter, and fruit cross diameter. 'TN 13' reaches its maximum weight and total soluble solids content increasing over the rate of 10°Brix after 100 d pollination, whereas 'TN 9'and 'TN 12' reached their maximum after 120–130 d after pollination. 'TN12' produced the least amounts of the respiration rate and the ethylene production rate during fruit ripening. Compared with 'TN 12', 'TN 9' produced a higher respiration rate by 1.75 times; 'TN 9' and 'Xue Mi' varieties produced higher ethylene production rates by 4 times. The peel color lightness of Tainung varieties was 50 at harvest. The peel chroma values of 'TN 9', 'TN 12' and 'TN 13' was 38, 30, and 43, respectively, at harvest. The hue angle of 'TN 9', 'TN 12' and 'TN 13' was 97°, 95°, and 110°, respectively, at harvest. The decay rate of 'TN 9' occurred earlier during the storage was higher than the other varieties, 'TN 12' chilling injury index rose fastest when being stored at 5℃ and 1℃. 'TN 13' performed slightly better than the control 'Jin Tao' variety at 5℃ and 1℃ in chilling injury index. The decay rate was slightly lower than the control 'Jin Tao' variety at 5℃ and 1℃. The total soluble solids performed better than the 'Jin Tao' varieties during storage.

Key words: India jujube, Tainung, Double sigmoid curve, Fruit growth and development, Storage life.

Received: November 2, 2021; Accepted: March 10, 2022.

* Corresponding author, e-mail: justinliang@mail.npust.edu.tw

1 Assistant Research Fellow, Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

2 Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

3 Associate Research Fellow and Division Director, Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

4 Research Fellow and Director, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

5 Associate Professor, Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung County, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):231–241 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0004

研究報告

開發可區分辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒的核酸和血清檢測方法

鄭櫻慧 [1,*] 陳金枝 [1] 王昭月 [2] 江佳典 [3] 張清安 [4]

摘要

鄭櫻慧、陳金枝、王昭月、江佳典、張清安。2022。開發可區分辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒的核酸和血清檢測方法。台灣農業研究 71(3):231–241。

辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 和番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 都是茄科番椒屬作物的 *Potyvirus* 屬病毒，且在 potyviruses 中，二者的鞘蛋白相似度最高，因此有高強度抗血清相關性，即利用純化病毒或鞘蛋白製備的多元抗體無法區分此二病毒。比對 ChiVMV 與 PVMV 的鞘蛋白基因與 3′ 非轉譯區，以鞘蛋白 N 端與 3′ 非轉譯區差異最大。因 3′ 非轉譯區長度差異大，以此區域設計專一性引子進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，利用增幅產物分子量大小不同，可以區分此二病毒。製備專一性抗血清則利用 ChiVMV 與 PVMV 之鞘蛋白 N 端差異大區域，以 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸 (4.3 kDa)，後接綠色螢光蛋白 (28.2 kDa)，使其成為複合蛋白加大分子量加強免疫反應，再以 pET-28b (+) 為表現載體，於 *Escherichia coli* Rosetta 產生一 32.5 kDa 之複合表現蛋白。大量表現此複合蛋白，加以純化後進行白兔免疫注射，獲得之多元抗體，進行 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 或西方漬染法，均可正確檢出感染 ChiVMV 之材料，而不與 PVMV 感染的煙草、甜椒和健康植株反應。用在檢測田間樣本時，與純化病毒製備之抗血清比較，可正確區分樣本是否為 ChiVMV 感染。比起製備單元抗體，利用細菌表現蛋白製備專一性多元抗血清，可不須經過繁複的步驟即可快速且簡便地得到 ChiVMV 專一性多元抗血清。

關鍵詞：辣椒葉脈斑駁病毒、表現蛋白、多元抗體。

前言

番椒 (*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L.) 屬於茄科 (Solanaceae) 番椒屬 (*Capsicum*) 為一年生或多年生作物，主要分為甜椒 (sweet pepper) 和辣椒 (chili pepper)，原產於南美洲的秘魯和中美洲的墨西哥一帶。番椒在台灣栽培歷史悠久，台灣甜椒栽培始於 1960 年之後由美國引進栽培，夏季種植於中海拔地區，秋冬季則以中、南部地區栽培較多。目前主要栽培品種為一代交配種，品種依其果肉硬與柔軟分為『硬殼種』和『軟殼種』，若依其果肉顏色區分，綠色以外顏色歸為『彩色甜椒』。依據農委會統計年報 (https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx) 記載，台灣 2020 年番椒栽培面積約為 2,580 ha，產量達 30,072 Mg，主要產區依栽培面積由大至小排序為南投縣、嘉義縣、雲林縣、屏東縣、高雄市、台南市及台中市等地，週年均有生產。

番椒作物田間複合感染情形相當普遍 (Green

投稿日期：2021 年 11 月 16 日；接受日期：2022 年 3 月 14 日。
[*] 通訊作者：yhcheng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 朝陽科技大學生化科技研究所研究生。台灣 台中市。
[4] 朝陽科技大學生化科技研究所教授。台灣 台中市。

& Kim 1991; Agranovsky 1993)，台灣已發生的病毒包括：辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV)、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV)、番椒黃斑病毒 (pepper chlorotic spot virus; PCSV)、番椒微斑駁病毒 (pepper mild mottle virus; PMMoV)、番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus; PepMoV)、番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV)、馬鈴薯病毒 X (potato virus X; PVX)、馬鈴薯病毒 Y (potato virus Y; PVY)、煙草微綠嵌紋病毒 (tobacco mild green mosaic virus; TMGMV)、番茄斑點萎凋病毒 (tomato spotted wilt virus; TSWV)、番茄黃化捲葉泰國病毒 (tomato yellow leaf curl Thailand virus; TYLCTHV) 及西瓜銀斑病毒 (watermelon silver mottle virus; WSMoV) (Li & Chang 2005; Tsai *et al*. 2005; Jan *et al*. 2007; Cheng *et al*. 2009a, 2009b; Huang *et al*. 2010; Shih *et al*. 2010; Zheng *et al*. 2010; Cheng *et al*. 2011; Cheng *et al*. 2013)。除了 PVX、PMMoV 和 TMGMV 只經由機械傳播無媒介昆蟲外，其餘病毒均可經由媒介昆蟲傳播，其中 CMV、ChiVMV、PepMoV、PVY 及 PVMV 可經由蚜蟲傳播，WSMoV、PCSV 和 TSWV 由薊馬傳播，TYLCTHV 只經由煙草粉蝨種群傳播。

ChiVMV、PepMoV、PVY 及 PVMV 同屬於 *Potyvirus* 病毒屬，田間藉由蚜蟲與農事操作傳播，病毒感染造成葉片斑駁、嵌紋、葉脈透化或壞疽圓斑等，也造成果實畸形與植株矮化等病徵，嚴重影響收成。這 4 種病毒之間有程度不一的血清學相關性，尤以 ChiVMV 與 PVMV 最為顯著，以純化病毒製備的抗血清常無法區分此 2 種病毒 (Moury *et al*. 2005)。ChiVMV 與 PVMV 雖然有高度的血清學相關性，但 2 病毒的寄主範圍與分布地區有很大差異，ChiVMV 寄主範圍限於藜科和茄科植物 (Shah *et al*. 2008)；PVMV 則寄主範圍較為廣泛，共可感染 14 科 47 種植物。ChiVMV 首先於 1947 年於西馬來西亞發現 (Ong *et al*. 1980)，主要分布於亞洲的中國、印度、印尼、日本、韓國、馬來西亞、巴基斯坦、菲律賓、斯里蘭卡、台灣、泰國和越南，後在非洲的坦桑尼亞、大洋洲的巴布亞新幾內亞和歐洲的義大利也發現 ChiVMV (Gao *et al*. 2016; Tiberini *et al*. 2017)。PVMV 則於 1971 年發現於迦納 (Brunt & Kenten 1971)，主要發生於非洲各國，後於亞洲與美國也有發現紀錄 (Cheng *et al*. 2009b; Matsumoto *et al*. 2016)。

ChiVM 與 PVMV 全基因體之核苷酸相同度低於 70%，其轉譯出的聚合蛋白胺基酸相同度高於 72%，比較各個裂解後之蛋白產物，差異集中於 P1 蛋白、P3 蛋白、鞘蛋白 N 端。ChiVMV 與 PVMV 的鞘蛋白有 70% 左右的胺基酸相同度，但鞘蛋白 N 端 (ChiVMV 有 50 個胺基酸；PVMV 有 31 個胺基酸)，除蚜蟲傳播必須的 DAG 外，幾乎都不相同；鞘蛋白除 N 端以外區域，胺基酸相同度則高於 88%。為了解決傳統純化病毒免疫白兔製備的多元抗血清無法區分 ChiVMV 與 PVMV 的問題，本研究擬利用 ChiVMV 與 PVMV 於鞘蛋白 N 端差異大的區域製備 ChiVMV 的專一性抗血清，與 ChiVMV 與 PVMV 的 3′非轉譯區 (3′-nontranslated region; 3′-NTR) 長度差異大 (ChiVMV 約 284 nt; PVMV 約 376 nt) 設計簡併式引子，得以順利區分此 2 種病毒，專一性檢測對於田間調查病害發生或抗病育種有很大助益。

材料與方法

病毒來源、分離及保存

2006 年採集自水里的甜椒疑似病毒感染植株，呈現植株略微矮化及葉片出現嵌紋斑駁等病徵。甜椒葉片汁液以 10 倍量磷酸緩衝液研磨，進行接種試驗，在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 接種葉出現黃色圓斑，在奎藜上進行 3 次單斑分離，之後接種於圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 繁殖。此分離之病毒接種於甜椒與煙草，確認其對甜椒病原性與作為本試驗病毒材料來源，並以煙草病葉組織置於 50% 甘油中於 -20℃長期保存。

總量 RNA 之抽取、反轉錄聚合酶連鎖反應與鞘蛋白基因選殖與定序分析

取 100 mg 的煙草病葉，利用總量核酸純化試劑組 (Total RNA Extraction Miniprep System, Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行萃取。以

純化所得之 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (SolGent Co., Daejeon, Korea) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA、各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5 [5′-ATG(A/G)T(A/T/C)GA(A/R)(A/T/C)C(A/T/C/G)TGG-GG-3′]/oligo d(T)。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中，設定反應程序為 50℃下進行反轉錄 30 min，94℃變性 1.5 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min，50℃下煉合 1.5 min，72℃下聚合 2 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應產物以 1.2% agarose (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。RT-PCR 增幅所得之 1.3 kb DNA 片段以 TOPO TA-PCR Ⅱ Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 進行選殖。選殖株抽取質體再以限制酶 *Eco*RI 酶切確認插入 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司 (台灣台北市) 進行。定序之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Frederick, MD, USA) 分析軟體進行分析，並與 GenBank 上已登錄之核苷酸序列進行分析比對。

RT-PCR 鑑別辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒

前述純化所得之總量核酸進行單一步驟 RT-PCR，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA，各 2.5 μL 之 20 μM 引子 CPVMV-F (5′-TATTC(T/C)TCAGTGTGG(A/T/C)T(T/C)CCAC-CAT-3′/CPVMV-R (5′-TC(A/T)C(T/C)(A/T/G)(T/C)AA(A/G)CCATAA(A/C)(A/C)ATA(A/G)T(T/C)T)，引子位於 ChiVMV 與 PVMV 的 3′-NTR。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀中，設定反應程序為 50℃下進行反轉錄 30 min，94℃變性 1 min 30 s；後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min，52℃下煉合 1 min 30 s，72℃下聚合 1 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應產物以 1.2% agarose 電泳，分析增幅產物之分子量。

抗原蛋白之表現及製備

設計對應 ChiVMV 鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸的專一性引子 CVMCP-F：5′-A<u>CCATGG</u>GAAGCATGGAGAGAGTGACATT-3′/CVMCP-R：A<u>ACTAGT</u>CATCAACACTCTCTCCCGAC-3′，以感染 ChiVMV 之煙草總量 RNA 為模板進行 RT-PCR 反應，於 50℃下煉合 30 min，30 個循環反應：94℃下變性 1 min，52℃下煉合 1 min 30 s，72℃下聚合 1 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。增幅鞘蛋白 N 端基因之 117 bp，增幅 DNA 之 5′ 端有 *Nco*I 切位，3′ 端有 *Spe*I 切位。將增幅所得之 DNA 以 *Nco*I 和 *Spe*I 切割，剪接於同樣經 *Nco*I 和 *Spe*I 酶切之攜帶綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) 基因之 pET28b (+) 載體 (Novagen Inc., Madison, WI, USA)，此載體先以 *Spe*I 與 *Xho*I 將 GFP 基因選殖至 pET28b (+) 載體。選殖完成之載體轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基 (Laemmli 1970) 培養，並以 1 mg mL^{-1} 之 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導複合蛋白 (鞘蛋白 N 端與 GFP 之複合蛋白) 之表現，菌液以 7,700× *g* 離心 10 min 沉降細菌後，以 pH 8.0 Tris-EDTA 緩衝液溶解沉澱物，收集蛋白質進行 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳分析 (Li *et al*. 1998)，並經西方漬染法以市售之 His 抗體與純化病毒製備之抗血清確定複合蛋白之表現。進一步選用確定有鞘蛋白表現之選殖株進行大量表現蛋白之生產，方法乃參照以往之研究報告 (Chen *et al*. 2002)。

抗血清之製備

以純化的複合表現蛋白為抗原，肌肉注射於紐西蘭白兔，每週注射 1 次，連續注射 4 wk。病毒懸浮液 (1 mg mL^{-1}) 與等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合乳化後進行第一次注射，之後 3 次則以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 進行乳化。第 5 週開始進行耳朵靜脈採血。採得血液於 37℃中靜置 1 h，500× *g* 離心 10 min 使分層後吸取上層之血清，保存於 -20℃中備用。

西方漬染法

取0.1 g之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入200 μL之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β-mercaptoethanol, 0.015% bromophenol blue)，研磨後之萃取液以85℃加熱處理5 min，經SDS-PAGE電泳後，膠體上之蛋白轉漬於PVDF膜 (Millipore Co., Rockland, MA, USA)，之後以病毒抗血清進行漬染反應 (Chen *et al*. 2002)。

酵素連結免疫分析

試驗參照Clark & Adams (1977) 報告進行，取0.1 g之罹病葉組織，以3 mL之15 mM碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，取200 μL加入酵素免疫分析反應盤內，每樣品2個重複，置於4℃冰箱16 h進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以1× PBST緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗3次；其後加入180 μL供試抗體後，放置在37℃定溫箱反應2 h；再以1× PBST緩衝液沖洗3次後，每孔加入150 μL已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, USA)，置於37℃之定溫箱中反應2 h；最後再以1× PBST緩衝液沖洗3次後，再以120 μL/孔之比例加入濃度為1 mg mL^{-1}之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP, Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應後20–30 min，以ELISA讀值儀 (PTI max micro plate reader, Mlolecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長405 nm下之吸收值，做為評估病毒濃度高低之依據。樣品的讀值大於健康葉片之2倍者，視為正反應。

結果

病毒分離與寄主植物測定

甜椒葉片汁液以10倍量磷酸緩衝液研磨，進行接種試驗，在紅藜 (*C. amaranticolor*) 及奎藜 (*C. quinoa*) 接種葉出現黃色圓斑，在奎藜上進行3次單斑分離，之後接種於圓葉煙草 (*N. benthamiana*) 繁殖，得到仁愛分離株 (ChiVMV-RA)，做為試驗或接種來源，取病葉組織浸泡於50%甘油中置於-20℃，進行長期保存。ChiVMV-RA回接甜椒 (「翠綠星」，農友公司，台灣高雄市)，甜椒則出現葉片嵌紋及扭曲變形的明顯病徵；以台灣另一常見於番椒作物的PVMV相較，PVMV接種「翠綠星」甜椒時，只造成葉面斑駁的輕微病徵 (圖1)。

鞘蛋白基因之選殖、核苷酸序列分析及其與番椒嵌紋病毒鞘蛋白基因之比較

利用偵測*Potyvirus*之簡併式引子Hrp5和Pot1，以接種ChiVMV-RA的*N. benthamiana*葉片總量RNA進行RT-PCR，反應結果以1.2% agarose膠體電泳分析，增幅之DNA片段為0.5 kb和1.5 kb (圖2)。且取2增幅DNA片段，經TOPO TA選殖套組選殖後，所得之選殖株經定序後，0.5 kb大小之DNA增幅自煙草染色體之基因；1.5 kb大小之DNA定序分析，共有1,397個核苷酸，包含病毒之部分NIb基因 (248 nt)、鞘蛋白基因 (861 nt) 和3′-NTR (285 nt)。利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 之BLAST程式比對GenBank登錄之序列，其鞘蛋白基因與ChiVMV isolate P3215 (DQ854945) 最相近，有98.8%的相同度，有12個核苷酸不同，鞘蛋白基因轉譯出287個胺基酸，與isolate P3215比較，有4個胺基酸不同，其胺基酸序列相同度為98.4%。

相較於ChiVMV，PVMV的鞘蛋白基因有810個核苷酸，轉譯出270個胺基酸。其與ChiVMV的鞘蛋白基因僅有66.5%的核苷酸相同度與75.6%的胺基酸相似度，比對二者的胺基酸序列 (圖3)，明顯差異集中在鞘蛋白N端約50個胺基酸，其後至C端的胺基酸序列相同度高於88%，此結果與以ChiVMV純化病毒免疫白兔所製備的抗血清無法區分2病毒相符。

專一性核酸檢測技術建立

建立RT-PCR檢測技術時，選取ChiVMV與PVMV於3′-NTR長度差異大，ChiVMV之

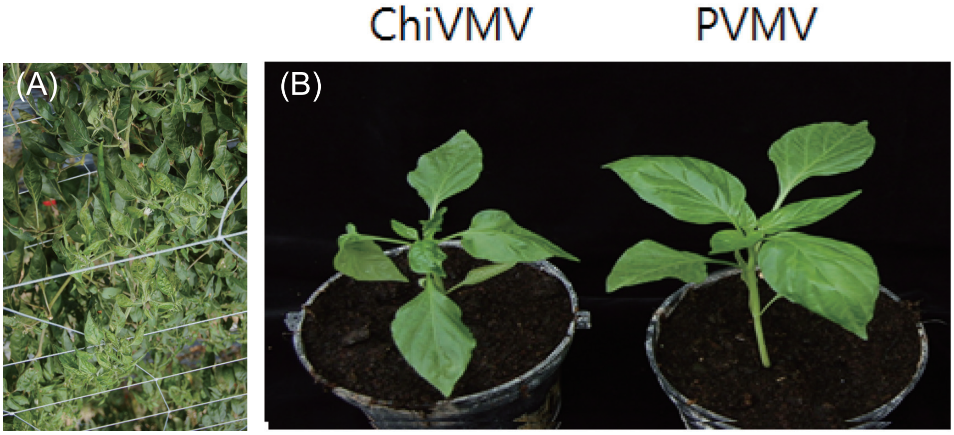

圖 1. 辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 感染甜椒之病徵。(A) 為田間栽培甜椒受到 ChiVMV 感染的病徵；(B) 為 ChiVMV 與番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 接種甜椒 (「翠綠星」HV-237，農友公司，台灣高雄市) 之病徵。

Fig. 1. Symptoms of pepper plants infected by chilli veinal mottle virus (ChiVMV). (A) ChiVMV-infected green pepper plant showing mosaic and leaf deformation symptoms in the field; (B) symptoms of green pepper (HV-237, Known You Seed Co., Kaohsiung, Taiwan) plants inoculated with ChiVMV or pepper veinal mottle virus (PVMV).

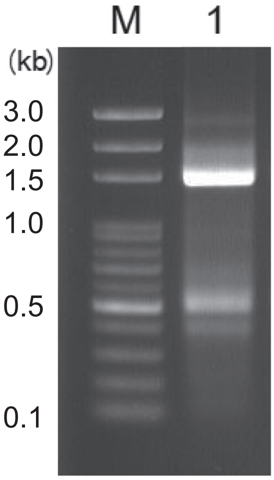

圖 2. 利用簡併式引子對 Hrp5/Pot1 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，增幅辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 基因體 3′ 末端序列。Total RNA 純化自 ChiVMV 接種之圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) (行 1)，分別得到分子量約 1.4 kb 與 0.5 kb 之 RT-PCR 產物。行 M 為分子量標誌。

Fig. 2. Amplification of the 3′-end portion of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) genome by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Two main DNA fragments of 1.4 kb and 0.5 kb were amplified from the total RNA extracted from ChiVMV-infected *Nicotiana benthamiana* using the degenerate primers Hrp5/Pot1 (lane 1). Lane M: molecular size markers.

3′-NTR 有 284 核苷酸，PVMV 之 3′-NTR 有 376 核苷酸，據此設計位於 3′-NTR 區域之引子對 CPVMV-F/CPVMV-R，ChiVMV 預期增幅 173 bp 產物，PVMV 則預期增幅 258 bp 產物，以 1.2% agarose 電泳分析可依其分子量加以判別。以此引子對偵測田間甜椒樣本，依產物分子量可區分受到 ChiVMV 或 PVMV 感染 (圖 4)。

複合表現蛋白與分子量測定

本試驗利用 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端與 PVMV 相異的 39 個胺基酸製備專一性抗體，推估 39 個胺基酸分子量為 4.3 kDa，恐引起的免疫反應不強，因此以鞘蛋白 N 端的 4.3 kDa 後接 GFP (28.2 kDa)，使成一分子量約 32.5 kDa 的複合蛋白。構築複合蛋白時，GFP 基因先以 *Spe*I 與 *Xho*I 選殖至 pET28b (+) 載體，設計對應 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸的引子對，以 RT-PCR 增殖，純化增殖 DNA 片段後，以 *Nco*I 與 *Spe*I 選殖於 GFP 之前。構築完成之載體轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3)，經 IPTG 誘導後表現之蛋白質大小約 32 kDa，與預估值相符 (圖 5A)。以西方漬染法分析，此表現蛋白可與市售之 His 抗血清有專一性反應

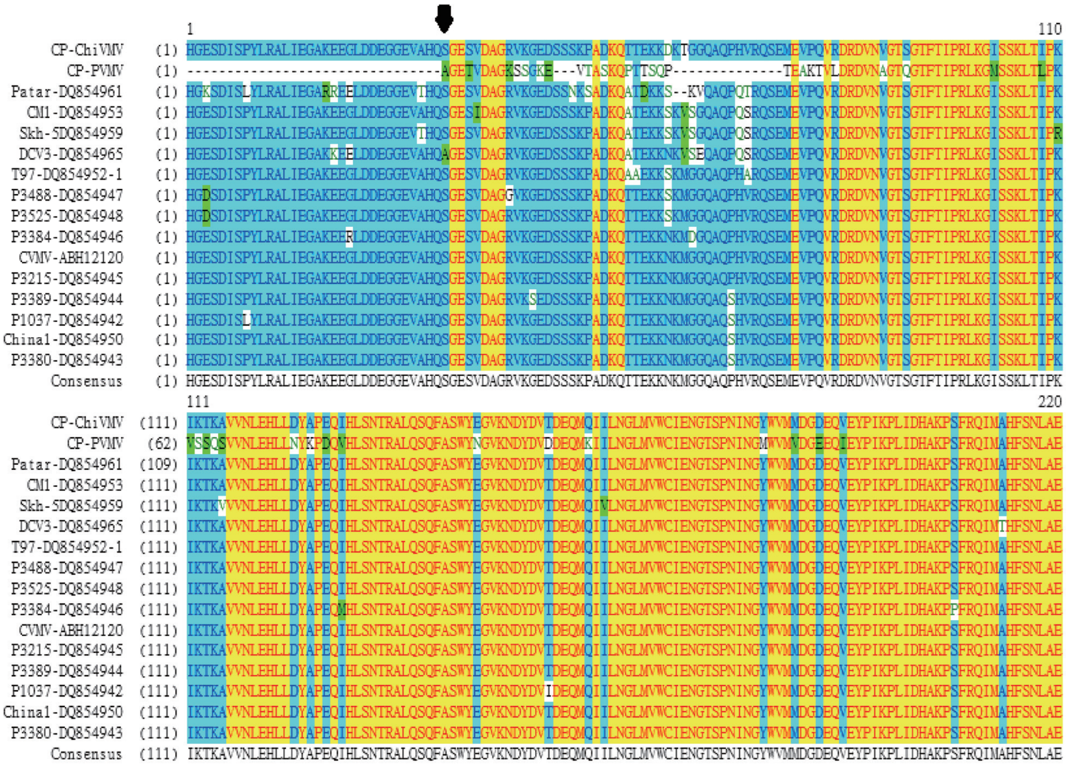

圖 3. 辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 和番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 部分鞘蛋白胺基酸序列比對。CP-ChiVMV 與 CP-PVMV 為 2 病毒台灣分離株，其餘序列為美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 登錄者，前為分離株名稱，後為登錄序號。鞘蛋白起始位置以箭頭標示。

Fig. 3. Comparison of deduced amino acid sequences of partial coat protein of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) and pepper veinal mottle virus (PVMV). The start amino acid of coat protein is indicated by an arrow.

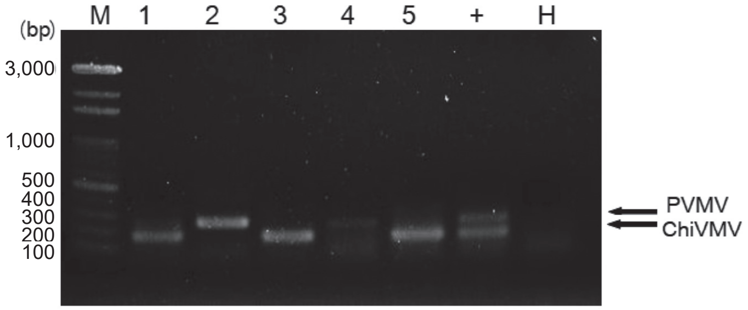

圖 4. 利用引子對 CPVMV-F/CPVMV-R 對田間採集疑似病毒感染甜椒樣本進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，檢測感染 chilli veinal mottle virus (ChiVMV) 與 pepper veinal mottle virus (PVMV) 其產物以電泳分析結果。行 1–5：為不同田間採集甜椒樣本；行 +：混合 ChiVMV 與 PVMV 抽取自感染煙草之總量 RNA 作為正對照；行 H：未接種甜椒之總量 RNA 作為負對照；行 M：marker。

Fig. 4. Detection of in sweet peppers by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the primer pair CPVMV-F/CPVMV-R. Lanes 1–5: Sweet pepper samples collected from different fields; lane +: Mixed total RNA of *Nicotiana benthamiana* plants infected with ChiVMV and PVMV as a positive control; lane H: Total RNA of mock-inoculated *N. benthamiana* as a negative control; lane M: molecular size markers. The expected amplicons are indicated by arrows.

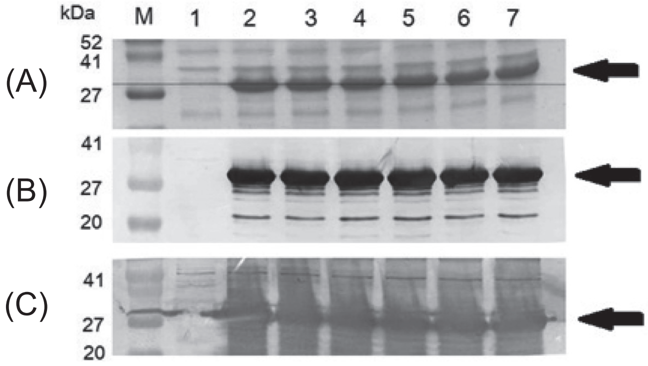

圖 5. 以膠體電泳與西方漬染法分析與篩選辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 部分鞘蛋白與綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) 複合表現蛋白的選植株。(A) 經 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導後表現之蛋白質；(B) 以市售之 His 抗血清進行西方漬染法分析及 (C) 以實驗室自製 ChiVMV 純化病毒免疫白兔所製備的抗血清進行西方漬染法分析。行 1：含有 pET28 之 *Escherichia coli* 對照株；行 2–7：誘導表現複合表現蛋白之 *E. coli* 選植株；行 M：蛋白分子量標誌。複合表現蛋白位置以箭頭標示。

Fig. 5. Analysis and screening of clones expressing fusion protein of the N-terminus of coat protein (CP) of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) and green fluorescent protein (GFP) by (A) sodium dodecyle sulfate-polyacryamide gel electrophoreses (SDS-PAGE) and (B) western blotting using the antisera against His tag or (C) ChiVMV CP. Lane 1: A *Escherichia coli* clone containing empty pET28 (+) vector as a negative control; lanes 2−7: *E. coli* clones containing recombinant vectors for expressing fusion protein; lane M: protein markers. The position of expected fusion protein is indicated by arrows.

(圖 5B)，也與實驗室自製 ChiVMV 純化病毒免疫白兔所製備的抗血清反應 (圖 5C)。

複合表現蛋白抗血清製備與應用

表現蛋白經 12% SDS-PAGE 分析，切取相對位置蛋白帶大量純化後，進行免疫注射白兔後，共採得約 100 mL 抗血清。抗血清稀釋 100–10,000× 進行 ELISA 時，與接種 ChiVMV 分離株的 *N. benthamiana* 呈正反應，選擇以稀釋 2,000× 進行以下實驗。

間接酵素聯結免疫分析與西方漬染法均以本實驗室製備之 ChiVMV 純化病毒與複合蛋白製備的抗血清為抗體進行測試對於 PVMV 與 ChiVMV 的專一性檢測能力。以西方漬染法進行分析，純化病毒抗血清 (以 AS-V 稱之) 與 PVMV 接種的番茄 (*Solanum lycopersicum*)、圓葉煙草 (*N. benthamiana*)、甜椒 (*C. annuum*) 及奎藜 (*C. quinoa*) 與 ChiVMV 接種的圓葉煙草 (*N. benthamiana*) 與甜椒 (*C. annuum*) 在高於 27 kDa 的位置都有明顯的反應條帶；複合蛋白抗血清 (以 AS-E 稱之) 只與 ChiVMV 接種的圓葉煙草與甜椒在高於 27 kDa 的位置有明顯的反應條帶，與 PVMV 接種的番茄、圓葉煙草、甜椒及奎藜在鞘蛋白預期位置無反應條帶；未接種的煙草與甜椒與 2 種抗血清均無此反應條帶 (圖 6A)。以間接酵素聯結免疫呈色分析上述樣本，與西方漬染法結果相同，AS-V 與 PVMV 及 ChiVMV 接種的植物測得反應值都在 2.5 以上，AS-E 只與 ChiVMV 接種的植物測得反應值高於 2.5，與 PVMV 接種的植物測得反應值近似未接種對照植物 (圖 6B)。

討論

ChiVMV 和 PVMV 都危害感染茄科番椒屬作物的 *Potyvirus* 屬病毒，2 病毒的寄主範圍不同，發源地與分布地區也不同，但有高強度抗血清相關性，以傳統的純化病毒製備的抗血清常無法區分此 2 種病毒。本研究選取 ChiVMV 與 PVMV 於鞘蛋白 N 端差異大的 39 個胺基酸，製備 ChiVMV 的專一性多元抗血清

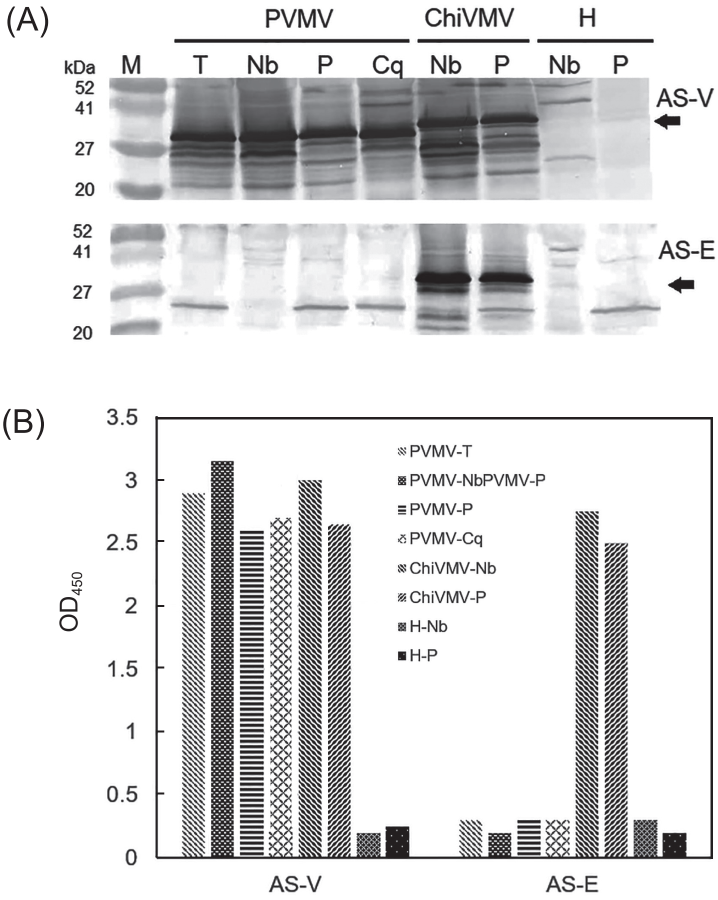

圖 6. (A) 以西方漬染法與 (B) 間接酵素聯結免疫呈色分析法分析純化病毒抗血清 (以 AS-V 稱之) 或複合表現蛋白 (以 AS-E 稱之) 檢測番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 與辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 接種植物，包含 PVMV 接種的番茄 (*Solanum lycopersicum*) (T)、圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) (Nb)、甜椒 (*Capsicum annuum*) (P) 及奎藜 (*Chenopodium quinoa*) (Cq) 與 ChiVMV 接種的圓葉煙草 (Nb) 與甜椒 (P)；未接種的圓葉煙草 (Nb) 與甜椒 (P) 為負對照；M 為蛋白分子量標誌。

Fig. 6. Detection of pepper veinal mottle virus (PVMV) and chilli veinal mottle virus (ChiVMV) in plants by antisera against viral particles of ChiVMV (called AS-V) or expressed fusion protein (called AS-E) in (A) Western blotting and (B) indirect enzyme-linked immunosorbent assay. PVMV-infected *Solanum lycopersicum* (T), *Nicotiana benthamiana* (Nb), *Capsicum annuum* (P) and *Chenopodium quinoa* (Cq), and ChiVMV-infected *N. benthamiana* (Nb) and *C. annuum* (P) were used for assay. Mock-inoculated *N. benthamiana* (Nb) and *C. annuum* (P) were used as negative controls. M: protein markers. The expected coat protein (CP) position is indicated by arrows.

AS-E，進行西方漬染法或 indirect ELISA，都可以明確區分此 2 種病毒，此抗血清適用於 ELISA 進行田間大量樣本檢測。利用 3′-NTR 核苷酸數目差異，設計簡併式引子對進行 RT-PCR，亦可依其產物分子量大小準確區分此 2 種病毒。RT-PCR 雖然靈敏度高，但僅為定性反應，而且能處理的樣本量少於 ELISA，仍無法取代抗血清，尤其是具有專一性的抗血清，為釐清是否為 ChiVMV 感染不可或缺的工具。

Tsai *et al*. (2008) 收集南亞與東南亞的 ChiVMV 分離株，加以定序分析，根據其鞘蛋白基因分為 3 群，根據圖 4 胺基酸序列比對分析，以複合表現蛋白製備之抗血清與 3 群病毒反應，亦即除了南亞與東南亞的 ChiVMV 分離株之外，也可以偵測到日本與中國的 ChiVMV 分離株。中國近年報導新的重組分

離株 (Rao *et al*. 2020)，報告中比對重組分離株與中國及其他各國分離株，鞘蛋白基因歸納成 2 大群，比較這些分離株之鞘蛋白 N 端與 ChiVMV-RA，39 胺基酸中最多只有 6 個胺基酸不同 (數據未顯示)，據此推估試驗中製備的複合表現蛋白抗血清以西方漬染法或 ELISA 仍可以專一性地檢出 ChiVMV。

實驗中選取的 39 個胺基酸推估分子量約 4.3 kDa，這個胜肽因太短恐抗原性不佳。解決胜肽太短問題，實務上常見以胜肽直接鏈結一個大的蛋白以加強免疫反應。本實驗直接在 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸，後接 GFP (28.2 kDa)，使成複合蛋白加大分子量加強免疫反應。再以 pET-28b (+) 為表現載體，大量表現此複合蛋白並純化後進行白兔免疫注射。GFP 為分離自水母的螢光蛋白，與植物蛋白相近的可能性極小，因此以複合表現蛋白免疫白兔製備的抗血清與感染其他病毒 (如 PVMV) 或未接種植物的反應極小，複合表現蛋白抗血清的高度專一性以西方漬染法或 ELISA 檢測時，很容易判別是否為 ChiVMV 感染。

本研究嘗試以 ChiVMV 之鞘蛋白專一性高的區域，複合水母之 GFP 蛋白，藉由病毒表現載體大量生產複合表現蛋白，以之免疫白兔獲得之專一性多元抗體，比單元抗體製備的時間短，過程簡單，耗用的費用也少，且深具實用價值。台灣早有 ChiVMV 感染辣椒的紀錄 (Green & Kim 1991)，而 PVMV 在台灣被發現後，已被記錄感染茄科的甜椒、辣椒、番茄和龍葵 (Cheng *et al*. 2009b) 與龍膽科的洋桔梗 (Cheng *et al*. 2009a)，應用此複合表現蛋白抗血清可以確實釐清田間番椒受到 PVMV 或 ChiVMV 危害，這些資料對病害管理與抗病育種等研究極具參考應用價值。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 98 農科 -9.3.1- 農 -C1(2) 計畫經費支持，更依賴王昭萍、江芬蘭及林雅雯等多位研究同仁共同協助完成，謹此致謝。

引用文獻

Agranovsky, A. A. 1993. Virus diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Ethiopia. J. Phytopathol. 138:89–97. doi:10.1111/j.1439-0434.1993.tb01364.x

Brunt, A. A. and R. H. Kenten. 1971. Pepper veinal mottle virus-A new member of the potato virus Y group from peppers (*Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L.) in Ghana. Ann. Appl. Biol. 69:235–243. doi:10.1111/j.1744-7348.1971.tb04676.x

Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:13–20. doi:10.7016/BBAS.200201.0013

Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Liao, D. T. Deng, and C. A. Chang. 2009a. Isolation and identification of *Pepper veinal mottle virus* on lisianthus. J. Taiwan Agric. Res. 58:196–207. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2009.05803.05

Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009b. First report of *Pepper veinal mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. Plant Dis. 93:107. doi:10.1094/PDIS-93-1-0107A

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, J. Y. Liao, C. A. Chang, and C. H. Chiang. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in bell pepper in Taiwan. Plant Dis. 95:617. doi:10.1094/PDIS-10-10-0721

Cheng, Y. H., Y. X. Zheng, C. H. Tai, J. H. Yen, Y. K. Chen, and F. J. Jan. 2013. Identification, characterisation and detection of a new tospovirus on sweet pepper. Ann. Appl. Biol. 164:107–115. doi:10.1111/aab.12084

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475

Gao, F., J. Jin, W. Zou, F. Liao, and J. Shen. 2016. Geographically driven adaptation of chilli veinal mottle virus revealed by genetic diversity analysis of the coat protein gene. Arch. Virol. 161:1329–1333. doi:10.1007/s00705-016-2761-7

Green, S. K. and J. S. Kim. 1991. Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review. Technical Bulletin No. 18. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. 60 pp.

Huang, C. H., Y. X. Zheng, Y. H. Cheng, W. S. Lee, and F. J. Jan. 2010. First report of *Capsicum chlorosis virus* infecting tomato in Taiwan. Plant Dis. 94:1263. doi:10.1094/PDIS-04-10-0275

Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hosoi, and W. S. Tsai. 2007. First

report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* in Taiwan. Plant Dis. 91:1363. doi:10.1094/PDIS-91-10-1363A

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structura1 proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680−685. doi:10.1038/227680a0

Li, C. Y. and Y. C. Chang. 2005. First identification of *Tobacco mild green mosaic virus* on *Capsicum annuum* in Taiwan. Plant Pathology 54:258. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01171.x

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3′-terminal region of *Dasheen mosaic virus* (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461−2469. doi:10.1007/s007050050476

Matsumoto, K., R. Yasaka, T. Setoyama, S. Kawano, and K. Ohshima. 2016. Chilli pepper rugose mosaic disease caused by *Pepper veinal mottle virus* occurs on Ishigaki Island, Japan. J. Gen. Plant Pathol. 82:57–60. doi:10.1007/s10327-015-0634-7

Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, and P. Gognalons. 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. Phytopathology 95:227–232. doi:10.1094/PHYTO-95-0227

Ong, C. A., G. Varghese, and T. W. Poh. 1980. The effect of *Chili veinal mottle virus* on yield of chili (*Capsicum annuum* L.). MARDI Res. Bull. 8:74–78.

Rao, S., X. Chen, S. Qiu, J. Peng, H. Zheng, Y. Lu, G. Wu, J. Chen, W. Jiang, Y. Zhang, and F. Yan. 2020. Identification of two new isolates of chilli veinal mottle virus from different regions in China: Molecular diversity, phylogenetic and recombination analysis. Front. Microbiol. 11:616171. doi:10.3389/fmicb.2020.616171

Shah, H., T. Yasmin, M. Fahim, S. Hameed, and M. I. Ul-Haque. 2008. Transmission and host range studies of Pakistani isolate of *Chilli veinal mottle virus*. Pak. J. Bot. 40:2669–2681.

Shih, S. L., W. S. Tsai, L. M. Lee, J. T. Wang, S. K. Green, and L. Kenyon. 2010. First report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* associated with pepper leaf curl disease in Taiwan. Plant Dis. 94:637. doi:10.1094/PDIS-94-5-0637B

Tiberini, A., A. Manglli, A. Ahmad, U. Cassia, and L. Tomassoli. 2017. First report and molecular identification of chilli veinal mottle virus in Italy. J. Plant Pathol. 99:523–526. doi:10.4454/jpp.v99i2.3891

Tsai, W. S., F. J. Jan, Y. C. Huang, and S. K. Green. 2005. Molecular characterization of five strains of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) in Taiwan. Plant Prot. Bull. 47:429–430.

Tsai, W. S., Y. C. Huang, D. Y. Zhang, K. Reddy, S. H. Hidayat, W. Srithongchai, S. K. Green, and F. J. Jan. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of chilli veinal mottle virus from South and Southeast Asia. Plant Pathol. 57:408–416. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01780.x

Zheng, Y. X., C. H. Huang, Y. H. Cheng, F. Y. Kuo, and F. J. Jan. 2010. First report of *Tomato spotted wilt virus* in sweet pepper in Taiwan. Plant Dis. 94:920. doi:10.1094/PDIS-94-7-0920B

Development of Nucleic Acid and Serological Methods for Differentiation of Chilli Veinal Mottle Virus and Pepper Veinal Mottle Virus

Ying-Huey Cheng[1,*], Chin-Chih Chen[1], Jau-Yeuh Wang[2], Chia-Dian Chiang[3], and Chin-An Chang[4]

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Wang, C. D. Chiang, and C. A. Chang. 2022. Development of nucleic acid and serological methods for differentiation of chilli veinal mottle virus and pepper veinal mottle virus. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):231–241.

Pepper crops are commonly infected with two potyviruses, chilli veinal mottle virus (ChiVMV) and pepper veinal mottle virus (PVMV) in Taiwan. ChiVMV and PVMV share the highest sequence similarity of coat protein genes among potyviruses, preventing serological differentiation between the two viruses. However, the nucleotide sequences between the N-terminal region of the coat protein and the 3′ non-coding region (3′-NTR) of two viruses are significantly different from each other. Based on 3′-NTR sequence divergence, ChiVMV and PVMV can be molecularly differentiated by designed primers in reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). For serological detection, the ChiVMV-specific antiserum was prepared using a fusion protein as an antigen. The antigen consisted of the divergent and most proximal N-terminal 39 amino acids (4.3 kDa) of ChiVMV coat protein as hapten and green fluorescent protein (28.2 kDa) as a carrier. Both heptan and carrier peptides were constructed into bacterial expression vector pET-28b (+) to produce an expressed fusion protein of 32.5 kDa in *Escherichia coli* Rosetta. The fusion protein was then immunized rabbits at regular intervals, and the harvested antiserum was used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or Western blotting to detect ChiVMV. The antiserum reacted positively and specifically to ChiVMV, but neither to PVMV nor non-inoculated plants. The ChiVAM-specific antiserum could specifically detect ChiVMV from field-collected samples, even in the presence of PVMV. When compared with the preparation of monoclonal antibodies, using the bacterial express fusion proteins containing ChiVMV partial coat protein to prepare polyclonal antisera is quicker, easier, and more economic.

Key words: Chilli veinal mottle virus (ChiVMV), Expression protein, Polyclonal antibody.

Received: November 16, 2021; Accepted: March 14, 2022.
[*] Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Graduate Student, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):243–266 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0005 研究報告

咖啡葉片內生炭疽菌種類之研究

吳昭蓉[1] 許淑麗[2] 賴素玉[2] 林妙純[2] 倪蕙芳[3,*]

摘要

吳昭蓉、許淑麗、賴素玉、林妙純、倪蕙芳。2022。咖啡葉片內生炭疽菌種類之研究。台灣農業研究 71(3):243–266。

本研究由南投縣仁愛鄉、雲林縣古坑鄉、嘉義縣中埔鄉及竹崎鄉、嘉義農業試驗分所、台南市東山區、台東縣泰武鄉等地 7 個咖啡園，採集健康咖啡葉進行表面消毒及組織分離，分離到之內生真菌共計有 859 株炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.)、475 株葉點黴屬真菌 (*Phyllosticta* spp.)、505 株炭角菌科 (Xylariaceae) 真菌及 214 株其他真菌。炭疽菌在 7 個咖啡園中所占比例最高。為進一步瞭解內生炭疽菌種類，利用 actin、calmodulin、chitin synthase、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 以及 β-tubulin 等序列，以貝氏演算法 (Bayesian inference) 建構類緣樹，結果顯示分離的炭疽菌種類包含 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種 (species complex)：*Colletotrichum cordylinicola*、*Colletotrichum fructicola*、*Colletotrichum gloeoporioides*、*Colletotrichum jiangxiense*、*Colletotrichum siamense*、*Colletotrichum theobromicola*、*Colletotrichum tropicale* 及 1 個尚未命名可能為新種的 *Colletotrichum* sp.，此外尚有 *Colletotrichum boninense* 複合種：*C. boninense* 及 *Colletotrichum karstii* 等共 10 種。針對南投仁愛、嘉義中埔、嘉義竹崎 3 個咖啡園進行葉片內生炭疽菌的種類及比例分析，發現南投仁愛及嘉義中埔之菌相種類組成較相近，其中 *C. cordylinicola* 在 2 園的比例分別占 83% 及 27%，且 2 園皆有 *C. siamense* 之存在。而嘉義竹崎咖啡園之炭疽菌則以 *C. karstii* 與 *C. fructicola* 比例最高，各占 45%，且未分離到 *C. cordylinicola* 及 *C. siamense*，而 *C. karstii* 則僅在嘉義竹崎咖啡園分離獲得，顯示咖啡葉內生炭疽菌種類具有豐富多樣性，且所組成之菌相依果園不同亦有所差異。本研究為國內外首篇利用多基因類緣分析方法解析咖啡葉片內生炭疽菌種類之報告，其結果可作為後續咖啡病害或內生菌相關研究之參考。

關鍵詞：咖啡、內生菌、炭疽菌。

前言

咖啡屬茜草科 (Rubiaceae) 植物，原產於熱帶非洲，1884 年引進台灣後少量推廣於民間種植，1918 年以後由園藝試驗場嘉義支場 (現今農業試驗所嘉義分所) 及士林園藝試驗分所進行咖啡試驗種植後，發現阿拉比卡咖啡最為適合台灣的風土環境，因此 1942 年之栽培面積曾達 1,000 ha，其後因二次世界大戰，多數咖啡田荒蕪，咖啡產業漸行式微。近年來，由於傳統產業結合觀光休閒事業之推動及國民消費能力的提高，喝咖啡的人口數逐年增加，帶動咖啡種植的農友愈來愈多，栽培面積目前持續增加中 (Chang *et al*. 2011)，根據行政院農業委員會農糧署農情報告資源網所載之 2020 年統計資料顯示，咖啡總栽培面積約 1,153 ha，主要栽培縣市依栽培面積依序為屏東縣 (231 ha)、南投縣 (189 ha)、台東縣 (154 ha) 及嘉義縣 (135 ha)。

植物內生真菌為寄生於植物體內完成全部

投稿日期：2021 年 10 月 4 日；接受日期：2022 年 3 月 18 日。
* 通訊作者：hfni@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
2 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 嘉義市。
3 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

或部分生活史，但通常並不造成植物顯現病徵的真菌 (Suryanarayanan 2013)。在農作物中，主要被報導的內生菌種類有 *Alternaria* spp.、*Aspergillus* spp.、*Chaetomium globosum*、*Cladosporium cladosporioides*、*Cladosporium* spp.、*Colletotrichum graminicola*、*Curvularia* spp.、*Epicoccum nigrum*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium* spp.、*Penicillium* spp.、*Scolecobasidium humicola*、*Trichoderma* spp.、*Xylaria* spp. 等 (Varma *et al*. 2017)。而其存在的功能，對於植物而言，已知內生菌可以幫助植物抵抗非生物逆境 (Saikkonen *et al*. 2010)、抑制植物病原菌、提高植物抗病或抗蟲的能力，有些重要且已被用來作為生物防治的蟲生真菌如白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 也被報導為棉花、菸草、小麥、大豆等之內生菌 (Arnold *et al*. 2003; Varma *et al*. 2017; Ramakuwela *et al*. 2020)。對於人類而言，研究內生菌可探索真菌的多樣性，具有學術價值，此外，內生菌產生豐富的次級代謝物及酵素，亦有應用於工業生產之潛力 (Debbab *et al*. 2011; Suryanarayanan *et al*. 2012)。

咖啡植株無論在根、莖、葉皆可發現內生菌的存在，不同部位的內生菌菌相各有差異，而葉部通常是內生菌數量及種類最豐富的部位 (Vega *et al*. 2010)。以咖啡全株而言，分離頻率最高的內生真菌為炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.)、*Fusarium* spp.、*Penicillium* spp. 以及炭角菌科 (Xylariaceae) 之真菌 (Vega *et al*. 2010)。如以根部為例，分離到最多的內生真菌依序為屬於炭角菌科之 *Xylaria* spp.、炭疽菌以及 *Guignardia* spp. (無性世代 *Phyllosticta* spp.) (Santamaría & Bayman 2005)。栽培方式亦會影響咖啡葉片內生菌的菌相，Oliveira *et al*. (2014) 比較咖啡慣行園和有機園的咖啡葉片內生菌菌相，發現慣行園分離頻率最高者為炭疽菌，有機園則是以 *Phyllosticta capitalensis* 為主。由以上研究，可知炭疽菌為咖啡中常見的內生菌，另外有部分研究指出，內生性的炭疽菌可能有抑制病原性炭疽菌的潛力 (Bongiorno *et al*. 2016)。

有關炭疽菌的分類，近年因為多基因類緣分析方法 (multi-locus sequence analysis) 發展，*Colletotrichum* 屬重新分類，對於種間的解析度提高，產生多個新種，其寄主範圍及病原性各有差異，目前可歸類為 14 個不同的複合種 (species complex)，其包括 248 個被認定的物種 (Cannon *et al*. 2012; Damm *et al*. 2012a, 2012b; Weir *et al*. 2012; Vieira *et al*. 2014; Jayawardena *et al*. 2021)。在此分類體系之下，發現許多先前未報導過的 *Colletotrichum* spp. 可造成咖啡炭疽病，例如 *Colletotrichum gigasporum*、*Colletotrichum karstii*、*Colletotrichum siamense* 及 *Colletotrichum theobromicola* 在墨西哥咖啡葉片上造成壞疽斑 (Cristóbal-Martínez *et al*. 2017)，或是中國在咖啡上分離得到的 *Colletotrichum brevisporum*、*Colletotrichum endophytica*、*Colletotrichum ledongense* 及 *Colletotrichum tropicale* 可危害果實。至於內生菌，雖然已有多篇報導指出炭疽菌為咖啡上常見的內生真菌，惟目前研究中，多半以外觀型態 (Oliveira *et al*. 2014) 或 internal transcribed spacer (ITS) (Vega *et al*. 2010) 序列鑑定，且大部分僅能鑑定至屬或複合種。

咖啡在台灣的種植歷史超過 100 年，有紀錄的真菌病害共有 18 種 (Tzean *et al*. 2019)，包括由 *Cercospora coffeicola* 引起的咖啡褐眼病，由 *Hemileia vastatrix* 引起的咖啡銹病以及 *Colletotrichum gloeosporioides* 所引起之咖啡炭疽病。咖啡褐眼病及銹病目前並無推薦藥劑可用，且由於咖啡的栽植目前亦儘量推動不使用農藥的友善管理模式，因此尋求適當的有益微生物為重點工作之一，而植物內生菌的探索可能為解決方案之一。

本研究之目的有二，其一為瞭解台灣咖啡葉片內主要的內生真菌種類，以供未來有益微生物篩選之用；其二則是比較不同園區之內生炭疽菌的組成及出現頻度之差異，以瞭解其多樣性，做為未來咖啡病害及內生菌相關研究之參考資訊。

材料與方法

咖啡葉片內生真菌之分離與保存

內生真菌取樣及組織分離以 Oliveira *et al*. (2014) 之方法略加修飾後援用。自南投縣仁愛

鄉、雲林縣古坑鄉、嘉義縣中埔鄉及竹崎鄉、嘉義農業試驗分所、台南市東山區、台東縣泰武鄉等地區之 7 個咖啡園，每園按健康咖啡株數之比例隨機採樣 5–10 棵樹，取其植株成熟葉，每棵樹隨機取 4 片葉子，將樣本依序置於 75% 酒精中 30 s，再浸泡於 1% 次氯酸鈉進行表面消毒 3 min，繼而以無菌水 30 s 漂洗 3 次，續以滅菌擦手紙吸去多餘水分，並將植物葉片組織切成大小約 1 cm × 1 cm 小塊，每片葉片隨機切取 5 小片，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化至 pH 3.8 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (acidified potato dextrose agar; APDA) [配製方法為以 750 µL 50% (v/v) 乳酸溶液加入 300 mL potato dextrose agar (PDA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)]，於室溫下培養，待內生真菌自葉片組織內長出後，依形態分類記錄，7 d 記錄 1 次，記錄至 14 d。另外，切下菌絲尖端或單孢至 PDA 進行純化培養並保存於 10℃下備用。各真菌之發生頻度的計算公式為：A 內生菌發生頻度 (%) = (由組織分離出 A 內生菌之葉片組織數/全部分離之葉片組織數) × 100%。南投仁愛、雲林古坑、嘉義分所、嘉義中埔、嘉義竹崎及台南東山之炭疽菌株以隨機方式抽樣 20–35% 之菌株進行後續分析。

內生菌種類鑑定

內生真菌鑑定方法，主要依據形態學與分子生物學。先觀察菌落形態特徵，待菌株產孢後，以孢子之形態等進行屬之鑑定 (Barnett & Hunter 1998)，若無產孢又為分離頻度高之真菌種類則進一步以 ribosomal ITS 片段之核苷酸序列進行分析。將待測菌株之培養菌絲以改進之 NaOH 簡易抽取植物 DNA 之方法進行 (Wang *et al*. 1993)。將所分離之病原菌培養於 PDA，待長出足量菌絲後，刮取少量菌絲，置於 200 µL 0.5 N NaOH 中，以手持式均質機均質約 1 min，再經離心去除其破碎菌絲殘體後，取上層液以 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 進行 10× 稀釋，所得稀釋液可作為 DNA 模板，進行 ITS 部分序列之增幅。本試驗所使用之 polymerase chain reaction (PCR) 溶液包含 1× PCR 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 0.1% (w/v) gelatin, 1% Triton X-100]、100 µM dNTP, 0.4 U Prozyme DNA polymerase (Protech Technology Enterprise, Taipei, Taiwan) 以及 0.2 µM primer，並加入無菌水使其總體積為 25 µL。所使用之 PCR 引子對包括：用於增幅 ITS 序列之 ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3′) 及 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) (White *et al*. 1990)。反應條件如下：94℃/4 min；接著以 94℃/30 s、52℃/30 s、72℃/30 s 進行 30 個循環；72℃/7 min，將增幅後 DNA 樣本與 EZ-vision DNA dye as loading buffer (Protech) 混合，以 1.5% Agarose gel 及 0.5× Tris/Borate/EDTA (TBE) 緩衝液進行核酸電泳分析。另外，所得 PCR 產物亦委託源資生物科技公司 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行核酸定序，定序後之核酸序列利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) GenBank 資料庫進行序列查詢與比對。

咖啡葉片內生炭疽菌分子類緣鑑定

對收集之咖啡內生炭疽菌菌株，首先進行 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 genes (ApMat) 及 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 基因片段之增幅，GAPDH 增幅之引子對為 GDF 及 GDR (Templeton *et al*. 1992)，ApMat 增幅之引子對為 AMF + AMR (Silva *et al*. 2012a)。以 GAPDH 或 ApMat 序列進行初步的菌株分群，再由不同分群中挑選菌株，進行 5 個基因序列串連的多基因類緣分析。多基因類緣分析所使用之基因片段包括 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS)、GAPDH 以及 β-tubulin (TUB)，其中 ACT、CAL、CHS 及 TUB 基因片段增幅之引子對分別為 ACT-512F 及 ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)、CL1C 及 CL2C (Weir *et al*. 2012)、CHS-79F 及 CHS-345R (Carbone & Kohn 1999)，以及 T1 (O’Donnell & Cigelnik 1997) 及 Bt2b (Glass & Donaldson 1995)。共同分析之菌株為參考 Weir *et al*. (2012) 及 Damm *et al*. (2012b) 所使用之菌株，並納入 2012 年後報告之炭疽新種菌株 (Manamgoda *et al*. 2013; Wang *et al*. 2016;

Sharma *et al*. 2017; De Silva *et al*. 2019)，將各菌株之序列 (表 1) 由 GenBank 資料庫下載後，與本研究之菌株基因序列 (表 2) 進行比較。各基因片段先以 ClustalX v.2.1 軟體 (Larkin *et al*. 2007) 進行相似度排列 (alignment) 後，以 jModeltest 進行 DNA 替換模型 (DNA substitution model) 最佳化預測，採用貝氏資訊準則方法 (Bayesian information criterion) 分析得到之 DNA 替換模型，套用於演化樹之建構。以 SequenceMatrix v.1.7.8 軟體 (Vaidya *et al*. 2011) 拼接各基因序列，並以 MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al*. 2012) 進行貝氏演算 (Bayesian inference; BI) 之樹型建構。進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generation)，每 1,000 個世代取 1 棵分析，為求分析準確，捨棄前 25% 世代。

咖啡葉片內生炭疽真菌菌株形態觀察

將菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行 3–4 d 活化後，切取菌落邊緣至 PDA 或合成低營養瓊脂培養基 [synthetic nutrient-poor agar (SNA)，配製方法為 1 L 之培養基加入 6 g agar、1 g KH_2PO_4、1 g KNO_3、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_20$、0.5 g KCl、0.2 g sucrose 及 0.2 g glucose] 上培養，在不照光之黑暗環境及 25℃之條件培養 7 d。以移植環挑取菌落孢子置於載玻片上，以干涉位相差顯微鏡 [differential interference contrast (DIC), Nikon 80i, Nikon, Tokyo, Japan] 觀察孢子形態並拍照紀錄。附著器 (appressoria) 之觀察參考 Weir *et al*. (2012) 之方法並略加修改後援用，沾取炭疽菌培養於 SNA 上產生之孢子泥，以無菌水稀釋成 1×10^4 spores mL^{-1} 濃度之孢子液，將水瓊脂培養基 (water agar; WA) 切成邊長 1 cm 的方塊，置於滅菌過之載玻片上，於 WA 塊滴上 10 μL 孢子液，而後覆蓋滅過菌之蓋玻片於 WA 塊上，將玻片放入保濕之玻璃培養皿中，黑暗中以 25℃培養 3 d，之後將玻片取出，以干涉位相差顯微鏡觀察玻片上之附著器並量測附著器大小。

結果

咖啡葉片內生真菌種類及其分離率

分離 7 個咖啡園區之咖啡葉片內生真菌分，初步經菌落外觀、產孢構造及 ITS 序列分子鑑定後，確認 *Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科之真菌所占比例較高，由 7 個園一共分離到 859 株 *Colletotrichum* spp.、475 株 *Phyllosticta* spp.、505 株炭角菌科真菌及 214 株其他種類之真菌，分離之比例如表 3 所示，各園真菌分離之比例以 *Colletotrichum* spp. 較高，在 7 個果園 *Colletotrichum* spp. 均有 70% 以上的分離率，尤其在嘉義中埔及雲林古坑咖啡園分離率更高達100%；而 *Phyllosticta* spp. 內生菌在 PDA 上呈現深墨綠色菌絲緊密之菌落 (圖 1A)，在不同咖啡園之間分離率差異大，南投仁愛及嘉義中埔之咖啡園未分離到 *Phyllosticta* spp.，但在嘉義分所咖啡園，分離率則有 77.6%；另外炭角菌科真菌則分離到 *Nemania* spp. 及 *Xylaria* spp.， 此 *Xylaria* spp. 在 PDA 上呈放射狀白色菌落，菌絲在培養基上呈現明顯束狀 (圖 1B)，*Nemania* spp. 亦呈放射狀白色菌落，但菌絲呈束狀之情形較不明顯 (圖 1C)。炭角菌科真菌在 7 個咖啡園均有 20% 以上的分離率，其中在嘉義中埔咖啡園分離率更達到 92%。其他零星分離到之真菌，包含 *Alternaria* spp.、*Cladosporium* spp.、*Fusarium* spp.、*Lasiodiplodia* spp.、*Pestalotia* spp 及 *Phomopsis* spp. 等，僅在部分咖啡園分離得到，其中僅有 *Pestalotia* spp. 在台南東山咖啡園分離比例較高，為 26%，其餘真菌之分離率皆不超過 5%。*Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科真菌除了在咖啡葉片上的分離率高之外，同一片葉子上亦常共存 2 種或 2 種以上的內生真菌。

以 GAPDH 或 ApMat 基因片段初步將咖啡葉內生炭疽菌分群

由南投仁愛、雲林古坑、嘉義分所、嘉義中埔、嘉義竹崎及台南東山等園共收集 147 株菌，初步以 ApMat 或 GAPDH 序列分析，結果顯示大多數炭疽菌株屬於 *C. gloeosporioides* 複合種，僅有由嘉義竹崎分離結果有數個菌株屬於 *C. boninense* 複合種。以本土 147 株炭疽菌 (表 2) 合併由 GenBank 擷取隸屬於 *C. gloeosporioides* 複合種之炭疽菌 (表 1) 中 28 個物種，應用 ApMat 基因片段序列以最大似

表 1. 本研究所使用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。

Table 1. List of *Colletotrichum* isolates used in this study with the country, host and GenBank accession number.

Species	Culture[z]	Host	Country	GenBank accession number[y]				
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB
Isolates used in *Colletotrichum gloeosporioides* species complex tree								
Colletotrichum aenigma	ICMP 18608	*Persea americana*	Israel	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010389
Colletotrichum aeschynomenes	ICMP 17673	*Aeschynomene virginica*	USA	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010392
Colletotrichum alatae	ICMP 17919; CBS 304.67	*Dioscorea alata*	India	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010383
Colletotrichum alienum	ICMP 12071	*Malus domestica*	New Zealand	JX010028	JX009654	JX009572	JX009882	JX010411
Colletotrichum aotearoa	ICMP 18537	*Coprosma* sp.	New Zealand	JX010005	JX009611	JX009564	JX009853	JX010420
	ICMP 18530	*Vitex lucens*	New Zealand	JX009911	JX009623	JX009521	JX009884	JX010419
	ICMP 18535	*Dacrycarpus dacrydioides*	New Zealand	JX009968	JX009617	JX009545	JX009766	JX010423
Colletotrichum asianum	ICMP 18696	*Mangifera indica*	Australia	JX009915	JX009723	JX009576	JX009753	JX010384
	ICMP 18605	*Mangifera indica*	Thailand	JX010021	JX009726	JX009465	JX009787	-
	ICMP 18580; CBS 130418	*Coffea arabica*	Thailand	JX010053	FJ917506	JX009584	JX009867	JX010406
Colletotrichum boninense (used as an out-group)	ICMP 17904; CBS 123755	*Crinum asiaticum* var. *sinicum*	Japan	JX009905	HM582004	JX009583	JX009827	-
Colletotrichum clidemiae	ICMP 18658	*Clidemia hirta*	USA, Hawaii	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010438
Colletotrichum cordylinicola	ICMP 18579	*Cordyline fruticosa*	Thailand	JX009975	HM470238	HM470235	JX009864	JX010440
Colletotrichum endophyticum	CAUG28	*Capsicum annuum*	China	KP145413	KP145357	KP145329	KP145385	KP145469
Colletotrichum endophyticum	UOM 1137	*Capsicum annuum*	Thailand	MH707467	-	MH781483	MH805853	MH846566
Colletotrichum fructicola	ICMP 12568	*Persea americana*	Australia	JX009946	JX009680	JX009529	JX009762	-
	ICMP 18613	*Limonium sinuatum*	Israel	JX009998	JX009675	JX009491	JX009772	JX010388
	ICMP 18610	*Pyrus pyrifolia*	Japan	JX010034	JX009681	JX009526	JX009788	-
	ICMP 18581	*Coffea arabica*	Thailand	JX010033	FJ917508	FJ907426	JX009866	JX010405
C. fructicola (syn. *Colletotrichum ignotum*)	ICMP 18646; CBS 125397	*Tetragastris panamensis*	Panama	JX010032	JX009674	JX009581	JX009874	JX010409
C. fructicola (syn. *Glomerella cingulata* var. *minor*)	ICMP 17921; CBS 238.49	*Ficus edulis*	Germany	JX009923	JX009671	JX009495	JX009839	JX010400
Colletotrichum gloeosporioides	ICMP 17821	*Citrus sinensis*	Italy	JX010056	JX009731	JX009531	JX009818	JX010445

表 1.　本研究所使用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Table 1.　List of *Colletotrichum* isolates used in this study with the country, host and GenBank accession number. (continued)

Species	Culture[z]	Host	Country	GenBank accession number[y]				
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB
C. gloeosporioides (syn. *Gloeosporium pedemontanum*)	ICMP 19121; CBS 273.51	*Citrus limon*	Italy	JX010054	JX009745	JX009558	JX009903	-
Colletotrichum hippeastri (used as an out-group)	ICMP 17920; CBS 241.78	*Hippeastrum* sp.	Netherlands	JX009932	JX009740	JX009485	JX009838	-
Colletotrichum horii	ICMP 10492	*Diospyros kaki*	Japan	GQ329681	JX009604	JX009438	JX009752	JX010450
Colletotrichum jiangxiense	CGMCC 3.17363; LF687	*Camellia sinensis*	China	KJ954902	KJ954752	KJ954471	-	KJ955348
Colletotrichum kahawae subsp. *ciggaro*	ICMP 18539	*Olea europaea*	Australia	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010434
C. kahawae subsp. *ciggaro* (syn. *Glomerella cingulata* var. *migrans*)	ICMP 17922	*Hypericum perforatum*	Germany	JX010042	JX009636	JX009450	JX009840	JX010432
C. kahawae subsp. *ciggaro* (syn. *Glomerella rufomaculans* var. *vaccinii*)	ICMP 19122; CBS 124.22	*Vaccinium* sp.	USA	JX009950	JX009744	JX009536	JX009902	JX010433
C. kahawae subsp. *kahawae*	ICMP 17816	*Coffea arabica*	Kenya	JX010012	JX009642	JX009452	JX009813	JX010444
Colletotrichum makassarense	CBS 143664	*Capsicum annuum*	Indonesia	MH728820	-	MH781480	MH805850	MH846563
Colletotrichum musae	ICMP 19119; CBS 116870	*Musa* sp.	USA	JX010050	JX009742	JX009433	JX009896	HQ596280
Colletotrichum nupharicola	ICMP 17938; CBS 469.96	*Nuphar lutea* subsp. *polysepala*	USA	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010397
Colletotrichum perseae	GA100	*Persea americana*	Israel	KX620242	KX620206	KX620145	-	KX620341
Colletotrichum psidii	ICMP 19120; CBS 145.29	*Psidium* sp.	Italy	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010443
Colletotrichum queenslandicum	ICMP 1778	*Carica papaya*	Australia	JX009934	JX009691	JX009447	JX009899	JX010414
Colletotrichum salsolae	ICMP 19051	*Salsola tragus*	Hungary	JX009916	JX009696	JX009562	JX009863	JX010403
Colletotrichum siamense	ICMP 12565	*Persea americana*	Australia	JX009937	JX009698	JX009571	JX009760	-
	ICMP 18121	*Dioscorea rotundata*	Nigeria	JX009942	JX009715	JX009460	JX009845	JX010402
	ICMP 18739	*Carica papaya*	South Africa	JX009921	JX009716	JX009484	JX009794	-
	ICMP 18578	*Coffea arabica*	Thailand	JX009924	FJ917505	FJ907423	JX009865	JX010404
C. siamense (syn. *C. hymenocallidis*)	ICMP 18642; CBS 125378	*Hymenocallis americana*	China	JX010019	JX009709	GQ856775	GQ856730	JX010410

表 1. 本研究所使用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Table 1. List of *Colletotrichum* isolates used in this study with the country, host and GenBank accession number. (continued)

Species	Culture[z]	Host	Country	GenBank accession number[y]				
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB
C. siamense (syn. *C. jasmini-sambac*)	ICMP 19118; CBS 130420	*Jasminum sambac*	Vietnam	HM131497	JX009713	HM131507	JX009895	JX010415
Colletotrichum tainanense	CBS 143666	*Capsicum annuum*	Taiwan	MH728823	-	MH781475	MH805845	MH846558
	UOM 1119	*Capsicum annuum*	Taiwan	MH728819	-	MH781487	MH805857	MH846570
Colletotrichum theobromicola	ICMP 18649; CBS 124945	*Theobroma cacao*	Panama	JX010006	JX009591	JX009444	JX009869	JX010447
C. theobromicola (syn. *C. fragariae*)	ICMP 17927; CBS 142.31	*Fragaria* × *ananassa*	USA	JX010024	JX009592	JX009516	JX009830	JX010373
C. theobromicola (syn. *C. gloeosporioides* f. *stylosanthis*)	ICMP 17957; CBS 124251	*Stylosanthes viscosa*	Australiax	JX009962	JX009597	JX009575	JX009821	JX010380
Colletotrichum ti	ICMP 4832	*Cordyline* sp.	New Zealand	JX009952	JX009649	JX009520	JX009898	JX010442
Colletotrichum tropicale	ICMP 18672	*Litchi chinensis*	Japan	JX010020	JX009722	JX009480	JX009826	JX010396
	ICMP 18653; CBS 124949	*Theobroma cacao*	Panama	JX010007	JX009719	JX009489	JX009870	JX010407
	ICMP 18651	*Annona muricata*	Panama	JX010014	JX009720	JX009570	JX009868	-
Colletotrichum wuxiense	CGMCC 3.17894	*Camellia sinensis*	China	KU252045	KU251833	KU251672	KU251939	KU252200
Colletotrichum xanthorrhoeae	ICMP 17903; CBS 127831	*Xanthorrhoea preissii*	Australia	JX009927	JX009653	JX009478	JX009823	JX010448
Glomerella cingulata "f.sp. *Camelliae*"	ICMP 18542	*Camellia sasanqua*	USA	JX009994	JX009628	JX009488	JX009857	JX010429
Isolates used in *Colletotrichum boninense* species complex tree								
Colletotrichum annellatum	CBS129826	*Hevea brasiliensis*	Colombia	JQ005309	JQ005743	-	-	JQ005656
Colletotrichum beeveri	CBS128527; ICMP 18594	*Brachyglottis repanda*	New Zealand	JQ005258	JQ005692	-	-	JQ005605
Colletotrichum boninense	CBS123755	*Crinum asiaticum* var. *sinicum*	Japan	JQ005240	JQ005674	-	-	JQ005588
	CBS128526; ICMP 18591	*Dacrycarpus dacrydioides*	New Zealand	JQ005249	JQ005683	-	-	JQ005596
	CBS128547; ICMP 10338	*Camellia* sp.	New Zealand	JQ005246	JQ005680	-	-	JQ005593

表 1. 本研究所使用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Table 1. List of *Colletotrichum* isolates used in this study with the country, host and GenBank accession number. (continued)

Species	Culture[z]	Host	Country	GenBank accession number[y]				
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB
Colletotrichum brasiliense	CBS128501; ICMP 18607	*Passiflora edulis*	Brazil	JQ005322	JQ005756	-	-	JQ005669
Colletotrichum brassicicola	CBS101059	*Brassica oleracea* var. *gemmifera*	New Zealand	JQ005259	JQ005693	-	-	JQ005606
Colletotrichum colombiense	CBS129818	*Passiflora edulis*	Colombia	JQ005261	JQ005695	-	-	JQ005608
Colletotrichum constrictum	CBS128504; ICMP 12941	*Citrus limon*	New Zealand	JQ005325	JQ005759	-	-	JQ005672
Colletotrichum cymbidiicola	IMI347923	*Cymbidium* sp.	Australia	JQ005253	JQ005687	-	-	JQ005600
	CBS123757	*Cymbidium* sp.	Japan	JQ005255	JQ005689	-	-	JQ005602
Colletotrichum dacrycarpi	CBS130241; ICMP 19107	*Dacrycarpus dacrydioides*	New Zealand	JQ005323	JQ005757	-	-	JQ005670
C. gloeosporioides (used as an outgroup)	CBS112999	*Citrus sinensis*	Italy	JQ005239	JQ005673	-	-	JQ005587
Colletotrichum hippeastri	CBS125376	*Hippeastrum vittatum*	China	JQ005318	JQ005752	-	-	JQ005665
Colletotrichum karstii	CBS129833	*Musa* sp.	Mexico	JQ005262	JQ005696	-	-	JQ005609
	CBS110779	*Eucalyptus grandis*	South Africa	JQ005285	JQ005719	-	-	JQ005632
	CBS127552	*Eugenia uniflora*	Brazil	JQ005304	JQ005738	-	-	JQ005651
	CBS106.91	*Carica papaya*	Brazil	JQ005307	JQ005741	-	-	JQ005654
Colletotrichum novae. Zelandiae	CBS128505	*Capsicum annuum*	New Zealand	JQ005315	JQ005749	-	-	JQ005662
Colletotrichum oncidii	CBS129828	*Oncidium* sp.	Germany	JQ005256	JQ005690	-	-	JQ005603
Colletotrichum parsonsiae	CBS128525	*Parsonsia capsularis*	New Zealand	JQ005320	JQ005754	-	-	JQ005667
Colletotrichum petchii	CBS125957	*Dracaena*	Netherlands	JQ005313	JQ005747	-	-	JQ005660
	CBS378.94	*Dracaena marginata*	Italy	JQ005310	JQ005744	-	-	JQ005657
Colletotrichum phyllanthi	CBS175.67	*Phyllanthus acidus*	India	JQ005308	JQ005742	-	-	JQ005655
Colletotrichum torulosum	CBS128544; ICMP 18586	*Solanum melongena*	New Zealand	JQ005251	JQ005685	-	-	JQ005598

[z] ICMP: International Collection of Microorganisms from Plant, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CBS: CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Netherlands; IMI: culture collection of CABI Europe UK centre, Egham, UK.

[y] ACT: actin gene; CAL: calmodulin gene; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TUB: β-tubulin.

表 2　本研究中由台灣咖啡葉內生炭疽菌菌株分離之來源地及其 GenBank 號碼。

Table 2. List of endophytic *Colletotrichum* spp. from coffee leaves in Taiwan with the location and GenBank accession number.

Species	Isolate	Location	GenBank accession number[z]					
			ACT	CAL	CHS	GAPDH	ApMat	TUB
Isolates used in *Colletotrichum gloeosporioides* species complex tree								
Colletotrichum cordylinicola	Col-1817	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438710	MZ488282	MZ457423	MZ457440	MZ543979	MZ509114
	Col-1844	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438711	MZ488283	MZ457424	MZ457441	MZ543980	MZ509115
	Col-1923	Dongshan District, Tainan City	MZ438712	MZ488284	MZ457425	MZ457442	MZ543981	MZ509116
	Col-2145	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438713	MZ488285	MZ457426	MZ457443	MZ543982	-
	Col-2147	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438714	MZ488286	MZ457427	MZ457444	MZ543983	-
	Col-2206	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ543988	MZ568788	MZ543990	MZ568793	MZ576496	-
Colletotrichum fructicola	Col-1925	Dongshan District, Tainan City	MZ438715	MZ488287	MZ457428	MZ457445	MZ543984	MZ509117
	Col-1928	Chiayi Agricultural Experiment Station	MZ438716	MZ488288	MZ457429	MZ457446	MZ543985	MZ509118
Colletotrichum gloeosporioides	Col-2257	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	MZ438717	MZ488289	MZ457430	MZ457447	MZ543986	-
Colletotrichum jiangxiense	Col-2241	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	MZ438718	MZ488290	MZ457431	MZ457448	MZ543987	MZ576491
Colletotrichum siamense	Col-1818	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438719	MZ488291	MZ457432	MZ457449	MZ568779	MZ509119
	Col-1819	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438720	MZ488292	MZ457433	MZ457450	MZ568780	MZ509120
	Col-1834	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438721	MZ488293	MZ457434	MZ457451	MZ568781	-
	Col-1924	Dongshan District, Tainan City	MZ438722	MZ488294	MZ457435	MZ457452	MZ568782	-
	Col-1929	Chiayi Agricultural Experiment Station	MZ438723	MZ488295	MZ457436	MZ457453	MZ568783	-
Colletotrichum theobromicola	Col-1905	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438724	MZ488296	MZ457437	MZ457454	MZ568784	MZ509121
	Col-2201	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ543989	MZ568789	MZ54399	MZ568794	MZ576497	-
Colletotrichum tropicale	Col-2165	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438725	MZ488297	-	MZ457455	MZ568785	MZ576492
Colletotrichum sp.	Col-1836	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438726	MZ488298	MZ457438	MZ457456	MZ568786	MZ509122
	Col-1837	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438727	MZ488299	MZ457439	MZ457457	MZ568787	MZ509123
Isolates used in *Colletotrichum boninense* species complex tree								
C. boninense	Col-2258	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568790	-	MZ568795	-	MZ576493
Colletotrichum karstii	Col-2247	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568791	-	MZ568796	-	MZ576494
	Col-2260	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568792	-	MZ568797	-	MZ576495

[z] ACT: actin gene; ApMat: intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 genes; CAL: calmodulin gene; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ITS: the ribosomal internal transcribed spacer; TUB: β-tubulin.

表 3.　*Collectotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科 (Xylariaceae) 真菌等內生真菌在 7 個不同地區咖啡園之咖啡葉中之分離頻度。

Table 3.　The isolation frequency of coffee endophyte including *Colletotrichum* spp., *Phyllosticta* spp. and Xylariaceous fungi, from coffee leaves from seven coffee orchards in different areas.

Collection site	Isolation frequency (%)[z]			
	Colletotrichum spp.	*Phyllosticta* spp.	Xylariaceous fungi	Other fungi
Ren-ai Township, Nantou County	97.9	0.0	22.1	5.7
Gukeng Township, Yunlin County	100.0	60.0	33.0	5.0
Chiayi Agricultural Experiment Station	76.8	77.6	78.8	25.6
Jhongpu Township, Chiayi County	100.0	0.0	92.0	13.0
(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	76.0	63.0	31.0	28.0
Dongshan District, Tainan City	76.0	40.0	72.0	37.0
Taiwu Township, Pingtung County	89.0	59.0	24.5	29.5

[z] Isolation frequency (%): the number of leaf discs from which the fungi was isolated/total leaf discs investigated.

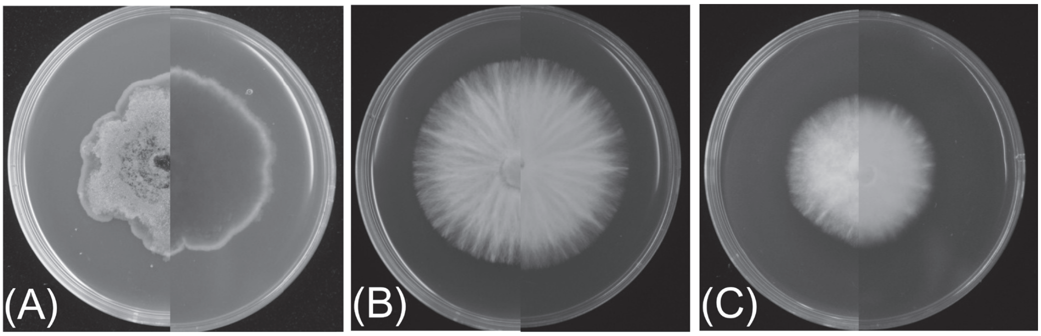

圖 1.　咖啡葉分離到之內生真菌 (A) *Phyllosticta* spp.、(B) *Nemania* spp. 及 (C) *Xylaria* spp. 在馬鈴薯瓊脂培養基上的菌落型態。(A–C) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。

Fig. 1.　Colony morphology on potato dextrose agar. (A) *Phyllosticta* spp., (B) *Nemania* spp. and (C) *Xylaria* spp. For (A–C), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse.

然性演算法 (maximum likelihood; ML) 進行分析。結果顯示，本研究之菌株可劃分成 12 個分支 (圖 2)，其中 C1–C3 分支與 *C. siamense* 接近，C4 為獨立的分支，包含 Col-1836、Col-1837 及 Col-2217，以 C4 分支 3 株菌的 ApMat 序列於 NCBI 網站進行 nBLAST 比對，最接近的已知種序列為 *C. siamense* ZLY3 菌株 (GenBank accession no. MT602136)，但其相似度僅有 93.3%。C5 分支包含數個已知為 *C. fructicola* 的菌株序列，C6 分支則包含 *C. tropicale*。C7 僅含 1 菌株 Col-2257，與 *C. gloeosporioides* 最接近。C8 亦為獨立分支，含 11 個菌株。C9 則與 *Colletotrichum kahawae* subsp. *kahawae* ICMP17816 以及 *Colletotrichum jiangxiense* CGMCC3.17363 劃為同一分支。C10 及 C11 與 *Colletotrichum cordylinicola* 劃在同一分支下，C12 分支則與 *C. theobromicola* 接近。

咖啡葉內生炭疽菌多基因類緣分析

為進一步確認 C1–C12 分支之菌株種類，由各分支挑選 1–3 株菌，進行 ACT、CAL、CHS、GAPDH 及 TUB 串聯的多基因分子進行 BI 法類緣鑑定 (圖 3)。結果顯示，屬於 C1 分支的 Col-1929、Col-1834，屬於 C2 分支的 Col-1819 以及屬於 C3 分支的 Col-1818、Col-

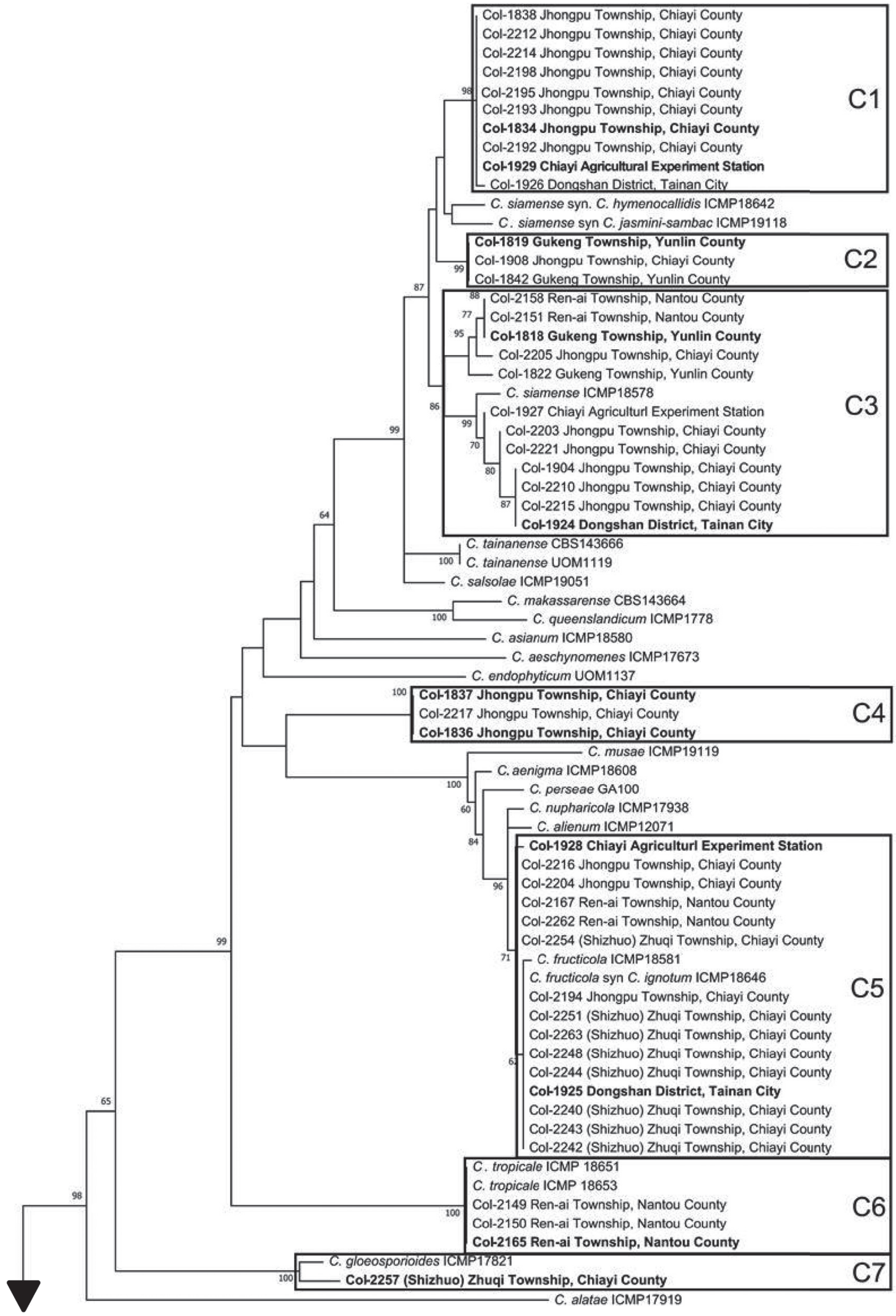

圖 2. 以 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 序列及 maximum likelihood 演算法分析咖啡葉內生炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的種類，並將其區分為 C1–C12 分支。粗體字表示之菌株為後續進行多基因類緣分析之菌株。

Fig. 2. Coffee endophytic *Colletotrichum* phylogenetic analysis based on intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 sequences using maximum likelihood algorithm. These isolates formed C1–C12 clades. Isolates used in sequential multi-locus phylogenetic analysis were emphasized in bold.

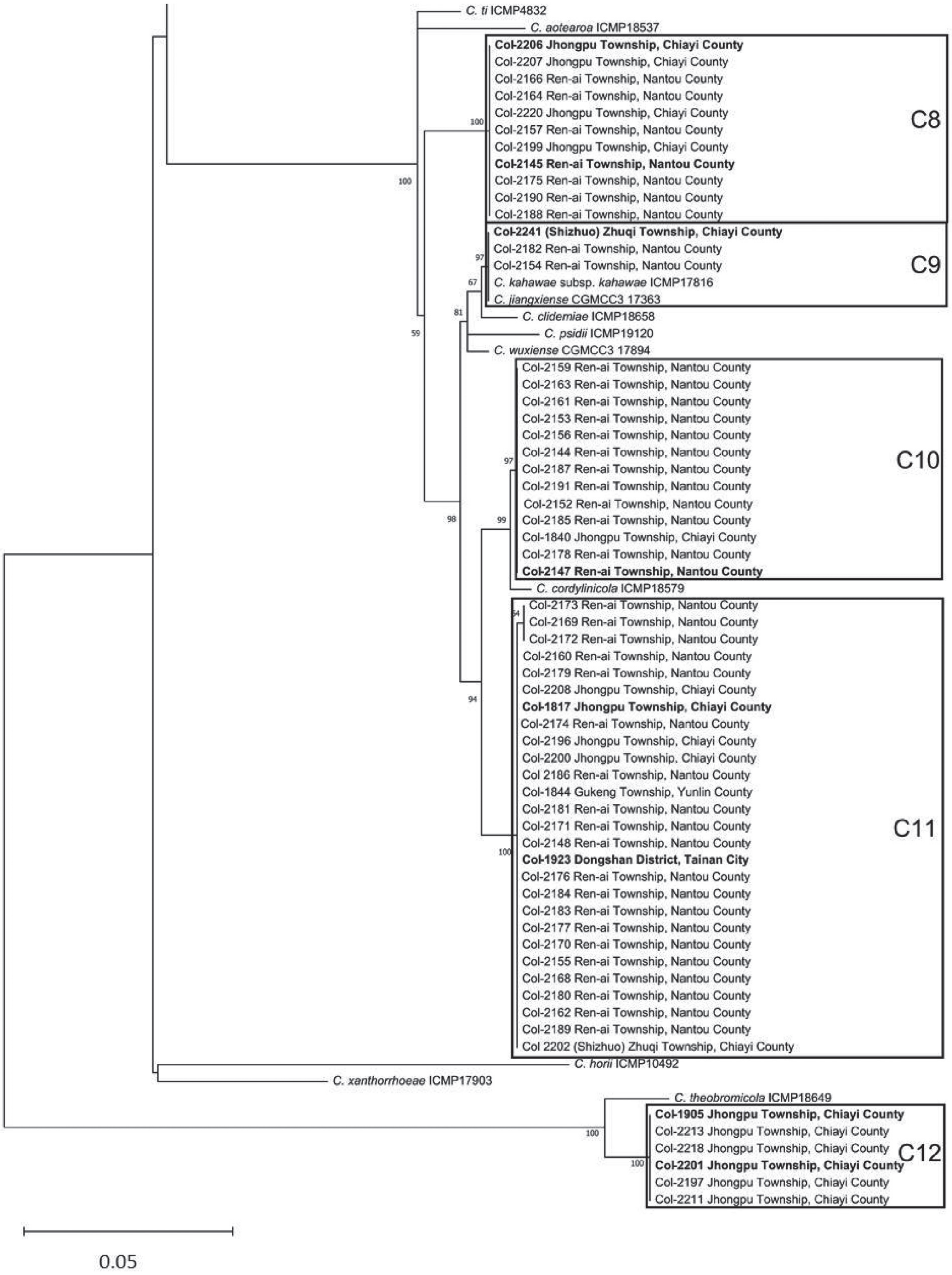

圖 2. 以 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 序列及 maximum likelihood 演算法分析咖啡葉內生炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的種類，並將其區分為 C1–C12 分支。粗體字表示之菌株為後續進行多基因類緣分析之菌株。(續)

Fig. 2. Coffee endophytic *Colletotrichum* phylogenetic analysis based on intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 sequences using maximum likelihood algorithm. These isolates formed C1–C12 clades. Isolates used in sequential multi-locus phylogenetic analysis were emphasized in bold. (continued)

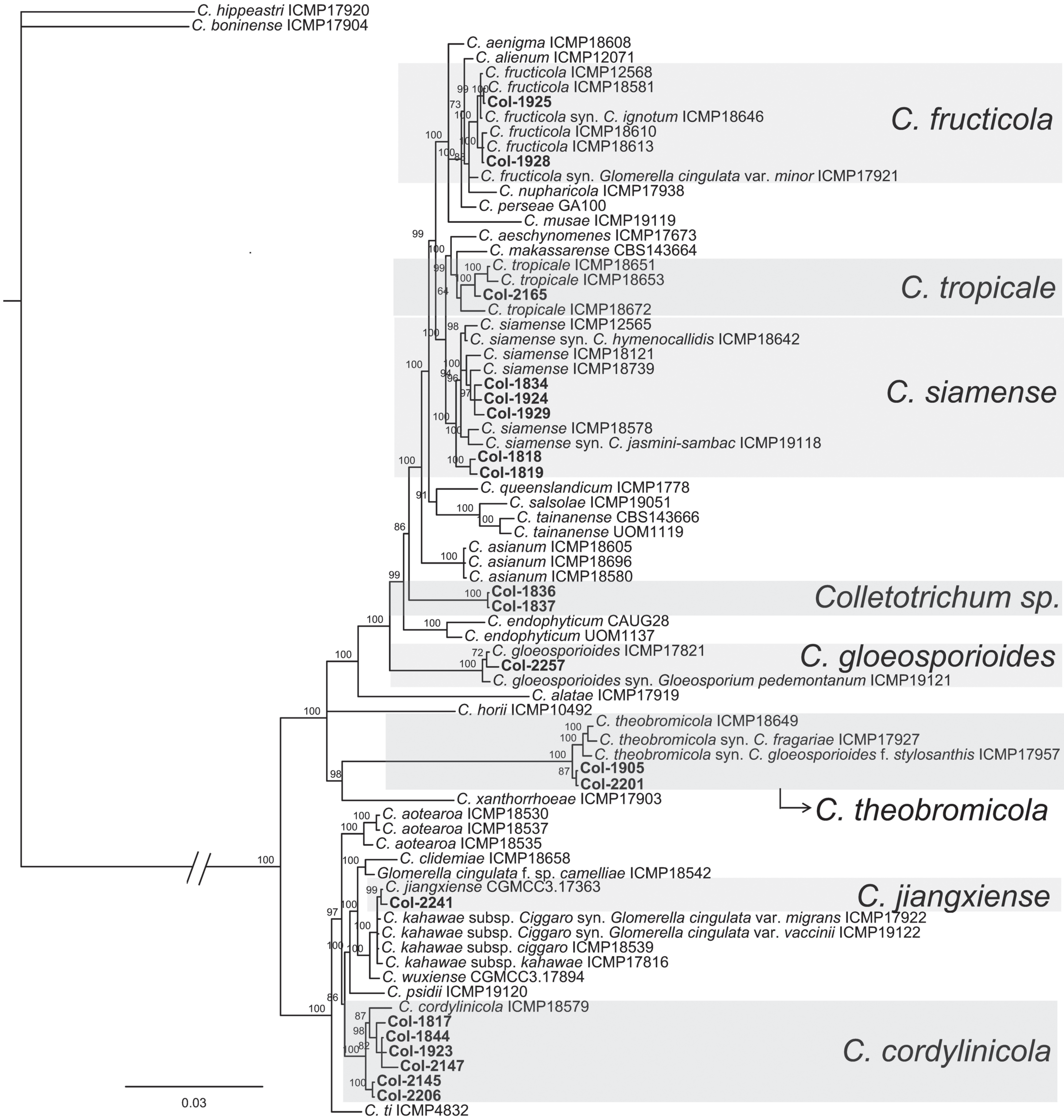

圖 3. 以 actin、calmodulin、chitin synthase、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 及 β-tubulin 基因片段對咖啡葉內生炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。粗體字表示之菌株為本研究之咖啡炭疽內生菌之菌株。

Fig. 3. Multi-locus phylogenetic analysis for *Colletotrichum gloeosporioides* complex in coffee leaves using Bayesian inference analysis, which is based on actin, calmodulin, chitin synthase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β-tubulin sequences. Isolates in this study were emphasized in bold.

1924 皆為 *C. siamense*，顯示 C1–C3 分支為 *C. siamense*。C4 分支的 Col-1836 及 Col-1837 則在多基因類緣分析中亦獨立形成 1 個分支，顯示 C4 分支可能為新種。C5 分支下的 Col-1925 及Col-1928 為 *C. fructicola*，顯示 C5 為 *C. fructicola*。經由 Col-2165 分析結果可知 C6 分支為 *C. tropicale*。C7 分支下的 Col-2257 為 *C. gloeosporioides*。C8 分支下的 Col-2145、C10 分支 Col-2147 以及 C11 分支下的 Col-1817、Col-1844 及 Col-1923 皆為 *C. cordylinicola*，

顯示 C8、C10 及 C11 為 *C. cordylinicola*。屬於 C9 分支的 Col-2241 則為 *C. jianxiense*。C12 分支下的 Col-1905 則屬於 *C. theobromicola*。

咖啡內生炭疽菌除了包含前述 *C. gloeosporioides* 複合種下的 7 個已知種及 1 個可能的新種外，在嘉義竹崎之咖啡園還發現多株 *C. boninense* 複合種之菌株。依據 GAPDH 序列之差異，取 Col-2248、Col-2258 及 Col-2260 菌株，經 ACT、GAPDH 及 CAL 多基因類緣分析，發現 Col-2258 為 *C. boninense*，Col-2247 及 Col-2260 則為 *C. karstii* (圖 4)。

咖啡葉內生炭疽菌型態觀察

本研究經由上述多基因類緣分析之 10 種咖啡葉內生炭疽菌，進行菌落及孢子型態觀察，結果如圖 5、圖 6 所示。就菌落型態而言，*C. gloeosporioides* 複合種中，大部分培養菌落為正面白色或淺灰色，背面則呈現淺黃、橘色或灰色 (圖 5 之菌落型態及圖 6A、E、I)，較特別的為 *C. fructicola* 分離株 Col-1928 在 PDA 上無論正反面都呈現深灰色 (圖 5I)，此種菌落型態亦出現在部分 *C. cordylinicola* 菌株上 (資料未顯示)，此外，部分 *C. cordylini-*

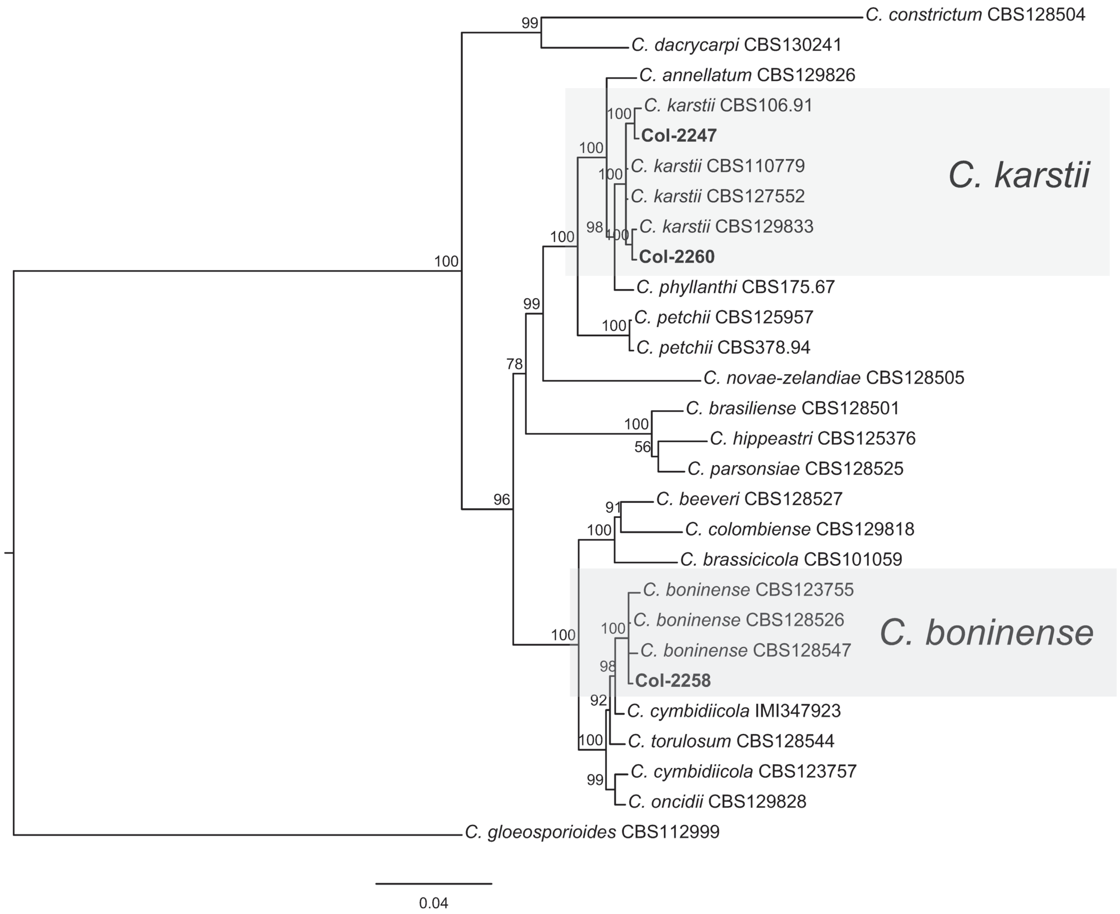

圖 4.　以 calmodulin、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 及 β-tubulin 基因片段對咖啡葉內生炭疽菌 *Colletotrichum boninense* 複合種以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。粗體字表示之菌株為本研究之咖啡炭疽內生菌之菌株。

Fig. 4.　Multi-locus phylogenetic analysis for *Colletotrichum boninense* complex in coffee leaves using Bayesian inference analysis, which is based on calmodulin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β-tubulin sequences. Isolates in this study were emphasized in bold.

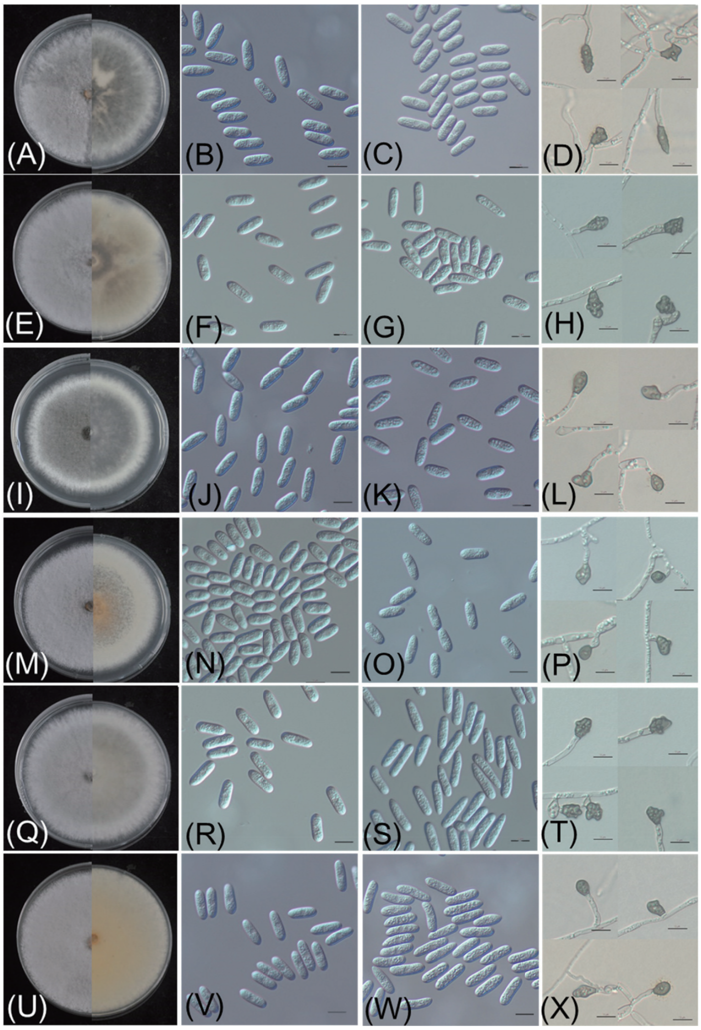

圖 5. 咖啡葉內生炭疽菌之型態。*Colletotrichum cordylinicola* Col-1844 菌株 (A) 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 之菌落型態；(B) 在合成低營養瓊脂培養基 (SNA) 上之孢子型態；(C) 在 PDA 上孢子型態及 (D) 附著器型態。*Colletotrichum cordylinicola* Col-2145 菌株 (E) 在 PDA 之菌落型態；(F) 在 SNA 上之孢子型態；(G) 在 PDA 上孢子型態及 (H) 附著器型態。*Colletotrichum fructicola* Col-1928 菌株 (I) 在 PDA 之菌落型態；(J) 在 SNA 上之孢子型態；(K) 在 PDA 上孢子型態及 (L) 附著器型態。*Colletotrichum gloeosporioides* Col-2257 菌株 (M) 在 PDA 之菌落型態；(N) 在 SNA 上之孢子型態；(O) 在 PDA 上孢子型態及 (P) 附著器型態。*Colletotrichum jiangxiense* Col-2241 菌株 (Q) 在 PDA 之菌落型態；(R) 在 SNA 上之孢子型態；(S) 在 PDA 上孢子型態及 (T) 附著器型態。*Colletotrichum siamense* Col-1834 菌株 (U) 在 PDA 之菌落型態；(V) 在 SNA 上之孢子型態；(W) 在 PDA 上孢子型態及 (X) 附著器型態。(A)、(E)、(I)、(M)、(Q) 及 (U) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。比例尺 = 10 μm。

Fig. 5. Morphology of coffee endophytic *Colletotrichum* species. *Colletotrichum cordylinicola* isolate Col-1844 (A) colony on potato dextrose agar (PDA); (B) conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA); (C) conidia on PDA and (D) appressoria. *Colletotrichum cordylinicola* isolate Col-2145 (E) colony on PDA; (F) conidia on SNA; (G) conidia on PDA and (H) appressoria. *Colletotrichum fructicola* isolate Col-1928 (I) colony on PDA; (J) conidia on SNA; (K) conidia on PDA and (L) appressoria. *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Col-2257 (M) colony on PDA; (N) conidia on SNA; (O) conidia on PDA and (P) appressoria. *Colletotrichum jiangxiense* Col-2241 (Q) colony on PDA; (R) conidia on SNA; (S) conidia on PDA and (T) appressoria. *Colletotrichum siamense* isolate Col-1834 (U) colony on PDA; (V) conidia on SNA; (W) conidia on PDA and (X) appressoria. For (A), (E), (I), (M), (Q) and (U), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse. Bar = 10 μm.

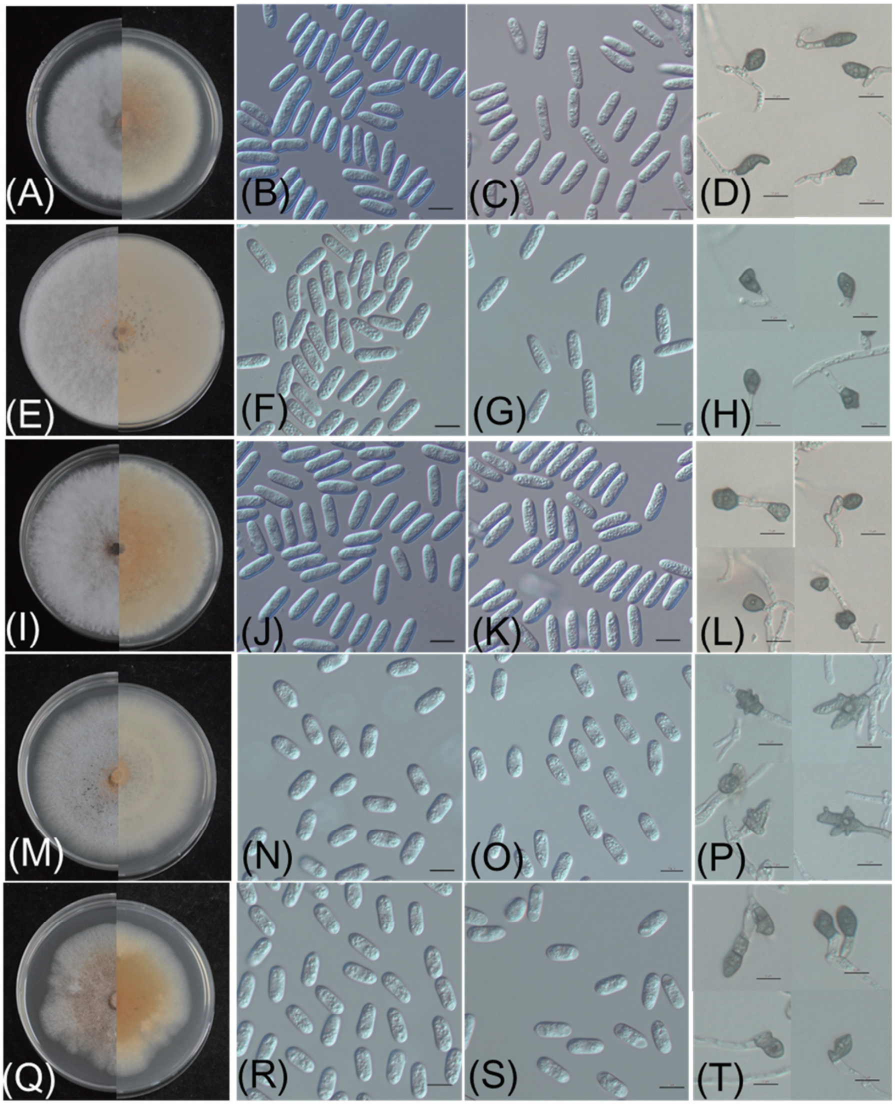

圖 6.　咖啡葉內生炭疽菌之型態。*Colletotrichum theobromicola* Col-1905 菌株 (A) 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 之菌落型態；(B) 在合成低營養瓊脂培養基 (SNA) 上之孢子型態；(C) 在 PDA 上孢子型態及 (D) 附著器型態。*Colletotrichum tropicale* Col-2165 菌株 (E) 在 PDA 之菌落型態；(F) 在 SNA 上之孢子型態；(G) 在 PDA 上孢子型態及 (H) 附著器型態。*Colletotrichum* sp. Col-1836 菌株 (I) 在 PDA 之菌落型態；(J) 在 SNA 上之孢子型態；(K) 在 PDA 上孢子型態及 (L) 附著器型態。*Colletotrichum boninense* Col-2258 菌株 (M) 在 PDA 之菌落型態；(N) 在 SNA 上之孢子型態；(O) 在 PDA 上孢子型態及 (P) 附著器型態。*Colletotrichum karstii* Col-2247 菌株 (Q) 在 PDA 之菌落型態；(R) 在 SNA 上之孢子型態；(S) 在 PDA 上孢子型態及 (T) 附著器型態。(A)、(E)、(I)、(M) 及 (Q) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。比例尺 = 10 μm。

Fig. 6.　Morphology of coffee endophytic *Colletotrichum* species. *Colletotrichum theobromicola* isolate Col-1905 (A) colony on potato dextrose agar (PDA); (B) conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA); (C) conidia on PDA and (D) appressoria. *Colletotrichum tropicale* isolate Col-2165 (E) colony on PDA; (F) conidia on SNA; (G) conidia on PDA and (H) appressoria. *Colletotrichum* sp. isolate Col-1836 (I) colony on PDA; (J) conidia on SNA; (K) conidia on PDA and (L) appressoria. *Colletotrichum boninense* isolate Col-2258 (M) colony on PDA; (N) conidia on SNA; (O) conidia on PDA and (P) appressoria. *Colletotrichum karstii* Col-2247 (Q) colony on PDA; (R) conidia on SNA; (S) conidia on PDA and (T) appressoria. For (A), (E), (I), (M) and (Q), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse. Bar = 10 μm.

cola 之菌落上有放射狀扇形色塊之特徵 (圖 5A)。而 *C. boninense* 複合種之 PDA 菌落，例如 *C. karstii* Col-2247 菌株，常在正面有大量明顯橘色產孢 (圖 6Q)。就孢子型態而言，*C. gloeosporioides* 複合種之孢子，無論在 SNA 或 PDA 培養基上皆產生短桿狀胞子 (圖 5 之孢子型態圖及圖 6B、C、F、G、J、K)，在 SNA 上產生之胞子，其長寬為 13.80–18.09 µm × 5.16–5.81 µm (表 4)，長寬之比例為 2.42–3.28，而在 PDA 上產生之孢子，其長寬為 14.97–18.12 µm × 4.78–5.50 µm，長寬比例為 2.60–3.44，其中 *C. gloeosporioides* 菌株 Col-2257 形狀較其他 *C. gloeosporioides* 複合種之菌株短胖 (圖 5N、O)。而 *C. boninense* 複合種之孢子較 *C. gloeosporioides* 複合種明顯短胖 (圖 6N、O、R、S)，在 SNA 上產生之孢子長寬為 13.64–14.53 µm × 6.68–6.81 µm，長寬比為 2.04–2.17，在 PDA 上產生之孢子長寬則為 14.07–15.09 µm × 6.52–6.63 µm，長寬比為 2.13–2.33。*C. gloeosporioides* 複合種在 WA 及玻片交界面產生之附著器型態，大多為橢圓形、近圓形或不整形 (圖 5 之附著器型態及圖 6D、H、L)，其長寬為 8.80–11.14 µm × 5.44–6.80 µm。*C. boninense* 複合種在 WA 及玻片交界面產生之附著器型態則為橢圓形或有多個小突起或裂瓣之不整形 (圖 6P、T)，其長寬為 8.57–12.34 µm × 6.69–6.88 µm。

不同咖啡園咖啡葉內生炭疽菌的種類及比例

為了探討不同咖啡園中各種內生炭疽菌所占之比例，以 3 地分離得到之菌株進行炭疽菌種類及比例分析，分別為南投仁愛 48 株分離株、嘉義中埔 30 株分離株及嘉義竹崎 29 株分離株 (圖 7)。其炭疽菌種之決定是由 ApMat 之分群 C1–C12 比對多基因類緣鑑定結果，確認每一分群對應之炭疽種，再觀察每一株菌屬於 C1–C12 分支以回推其種類。以結果發現，3 個咖啡園內生炭疽菌菌相之組成與比例差異頗大。其中南投仁愛咖啡園有 5 種炭疽菌，*C. cordylinicola* 所占比例 83% 為最高，其次為 *C. tropicale*，僅有 7%，其餘還包含 *C. jiangxiense*、*C. siamense* 以及 *C. fructicola*。嘉義中埔咖啡園以 *C. siamense* 所占比例 43% 為最高，其次為 *C. cordylinicola* (27%)，另外有 *C. theobromicola* (20%) 及 *C. fructicola* (10%)。嘉義竹崎咖啡園中，*C. fructicola* 及 *C. karstii* 各占了 45% 為最多，另外還有 *C. jianxiense* (4%)、*C. boninense* (3%) 以及 *C. gloeosporioides* (3%)。其中 *C. boninense*、*C. gloeosporioides* 及 *C. karstii* 僅在嘉義竹崎咖啡園發現。

討論

本篇報告調查台灣咖啡葉片內生真菌的種類及比例，並以分離率最高的炭疽菌為主要探討對象，由分子類緣關係、菌落、孢子大小及附著器形態等特徵分析其種 (species) 之差別，共發現 10 種咖啡內生炭疽菌，包括 *C. boninense*、*C. cordylinicola*、*C. fructicola*、*C. gloeosporioides*、*C. jiangxiense*、*C. karstii*、*C. siamense*、*C. theobromico*la、*C. tropicale* 以及 1 個可能為新種的 *Colletotrichum* sp.。比較南投仁愛、嘉義竹崎及嘉義中埔 3 個不同咖啡園中各種炭疽菌所占之比例，結果發現不同咖啡園間，內生炭疽菌的組成種類與比例不同，且彼此之間差異大，顯示出咖啡內生炭疽菌種類之多樣性。本報告為台灣首探討咖啡內生炭疽菌種類的報告，其結果可作為後續咖啡病害或內生菌相關研究之參考。

本研究中，咖啡葉內生炭疽菌種類豐富，其中包含 1 個可能尚未命名的新種，此結果顯示炭疽菌作為內生菌，在咖啡葉片內呈現高度多樣性，且可能有許多尚未被報導的種類，具有可發掘及探討的潛力。前人研究中，分析不同種類植物的內生炭疽菌，也同樣有此種高度多樣性的現象，亦發現多個新種。Vieira *et al*. (2014) 研究巴西北部芒果葉之內生炭疽菌，共發現了 7 個炭疽菌的已知種，其中包含了 *C. fructicola*、*C. karstii* 以及 *C. tropicale*，另外還發現 1 個新種 *Colletotrichum endomangiferae*。Ma *et al*. (2018) 研究中國及泰國北部 *Dendrobium* spp. 蘭花的內生炭疽菌，亦發現 5 種已知種的炭疽菌，包括了本研究中亦有發現的 *C. fructicola* 及 *C. jiangxiense*，此外還找到 5 個新種，總共有 10 種內生炭疽菌。Manamgoda

表 4. 本研究中咖啡葉內生炭疽菌在合成低營養瓊脂培養基與馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上分生孢子與附著器大小。

Table 4. The size of appressoria and conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA) and potato dextrose agar (PDA) of coffee leaves endophytic *Colletotrichum* spp. in this study.

		Conidia on SNA (n = 50)		Conidia on PDA (μm) (n = 50)		Appressorium (μm) (n = 35)
Species	Isolate	Length (μm) × width (μm)	Ratio	Length (μm) × width (μm)	Ratio	Length (μm) × width (μm)
Colletotrichum gloeoporioides complex						
Colletotrichum cordylinicola	Col-1844	15.84 ± 0.57 × 5.76 ± 0.24	2.75 ± 0.18	15.00 ± 1.15 × 5.45 ± 0.34	2.76 ± 0.29	10.96 ± 2.24 × 5.89 ± 0.96
	Col-2145	15.06 ± 0.63 × 5.40 ± 0.26	2.80 ± 0.18	14.97 ± 1.02 × 5.22 ± 0.24	2.88 ± 0.28	10.69 ± 1.86 × 6.38 ± 0.83
Colletotrichum fructicola	Col-1928	15.51 ± 0.90 × 5.81 ± 0.26	2.68 ± 0.22	15.37 ± 1.08 × 5.52 ± 0.42	2.81 ± 0.33	9.39 ± 1.48 × 6.32 ± 0.47
C. gloeoporioides	Col-2257	13.80 ± 0.72 × 5.72 ± 0.32	2.42 ± 0.23	14.21 ± 0.96 × 5.50 ± 0.34	2.60 ± 0.26	8.80 ± 1.23 × 6.29 ± 0.50
Colletotrichum jiangxiense	Col-2241	16.54 ± 0.79 × 5.67 ± 0.30	2.93 ± 0.22	18.12 ± 1.42 × 5.30 ± 0.32	3.44 ± 0.38	11.14 ± 1.98 × 6.37 ± 0.77
Colletotrichum siamense	Col-1834	16.87 ± 0.75 × 5.59 ± 0.24	3.03 ± 0.22	17.63 ± 1.43 × 5.32 ± 0.30	3.33 ± 0.36	9.43 ± 1.33 × 6.31 ± 0.74
	Col-1924	16.08 ± 0.72 × 5.43 ± 0.19	2.96 ± 0.18	16.45 ± 0.73 × 5.11 ± 0.35	3.24 ± 0.29	9.90 ± 1.35 × 6.80 ± 0.75
Colletotrichum theobromicola	Col-1905	15.67 ± 0.86 × 5.16 ± 0.29	3.05 ± 0.24	16.12 ± 1.06 × 4.78 ± 0.29	3.39 ± 0.33	10.15 ± 1.63 × 5.44 ± 0.56
Colletotrichum tropicale	Col-2165	15.50 ± 0.94 × 5.45 ± 0.26	2.85 ± 0.26	16.85 ± 1.38 × 5.26 ± 0.38	3.22 ± 0.37	10.26 ± 2.04 × 6.18 ± 0.71
Colletotrichum sp.	Col-1836	16.29 ± 1.63 × 5.42 ± 0.35	3.02 ± 0.32	16.82 ± 1.16 × 5.21 ± 0.35	3.25 ± 0.34	8.87 ± 1.73 × 6.39 ± 1.19
	Col-1837	18.09 ± 0.93 × 5.54 ± 0.23	3.28 ± 0.26	17.92 ± 1.12 × 5.22 ± 0.26	3.44 ± 0.29	9.49 ± 1.24 × 6.39 ± 0.74
Colletotrichum boninense complex						
C. boninense	Col-2258	13.64 ± 0.53 × 6.68 ± 0.25	2.04 ± 0.25	15.09 ± 0.87 × 6.52 ± 0.32	2.33 ± 0.22	12.34 ± 3.84 × 6.69 ± 0.73
Colletotrichum karstii	Col-2247	14.53 ± 0.57 × 6.70 ± 0.27	2.17 ± 0.12	14.07 ± 1.16 × 6.63 ± 0.40	2.13 ± 0.26	11.32 ± 2.24 × 6.75 ± 0.66
	Col-2260	14.39 ± 0.89 × 6.81 ± 0.24	2.11 ± 0.16	14.75 ± 0.98 × 6.62 ± 0.38	2.24 ± 0.25	8.57 ± 1.08 × 6.88 ± 0.85

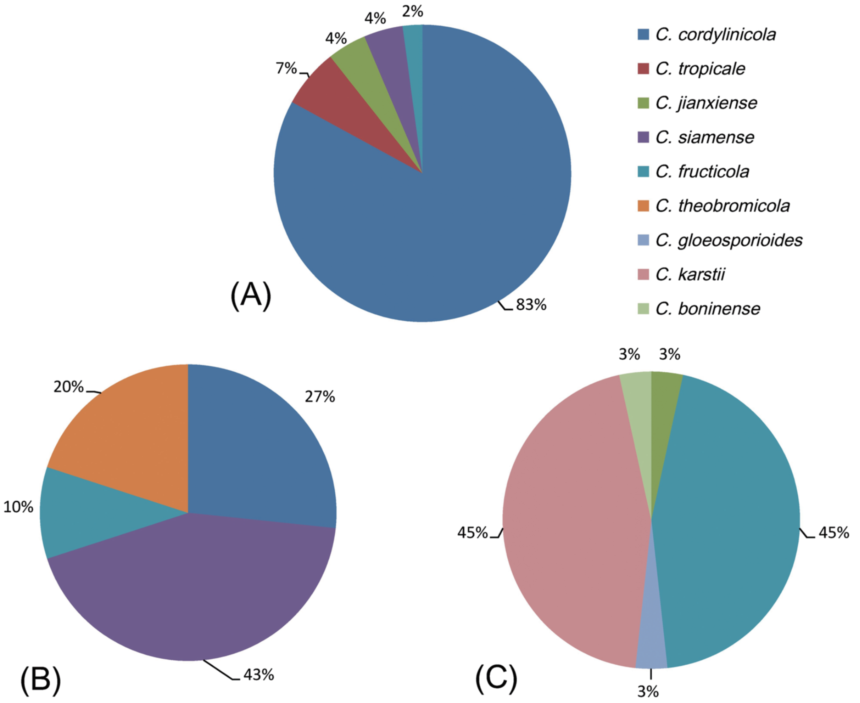

圖 7. (A) 南投仁愛；(B) 嘉義中埔及 (C) 嘉義竹崎 3 個咖啡園所採集之咖啡葉內生炭疽菌種類及分離頻度。

Fig. 7. Species composition and isolation frequency of coffee endophytic *Colletotrichum* species in orchards of (A) Ren-ai Township, Nantou County; (B) Jhongpu Township, Chiayi County; and (C) Zhuqi Township, Chiayi County.

et al. (2013) 則在 2 種熱帶的草類上發現 3 種內生炭疽菌 *C. fructicola*、*C. siamense* 及 *C. tropicale*，另外鑑定 1 個新種 *C. endophytica*。從前述研究，除可看出炭疽菌在植物體內種類的豐富程度外，亦可發現其中有數種炭疽菌，尤其是 *C. fructicola* 及 *C. tropicale*，是植物體內常見的內生炭疽菌種類。

在真菌進行分子鑑定時，常使用 ITS 基因片段進行分析，但其應用於炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 之鑑定，較可能產生誤判而無法確實鑑別種間之差異 (Crouch *et al*. 2009; Damm *et al*. 2009)，相較之下，ApMat 及 GAPDH 則可提供較佳的解析度，其中 ApMat 可區分至亞種 (subspecies) (Weir *et al*. 2012; Sharma *et al*. 2013)，然而，僅憑單一序列進行種之鑑定仍有誤判之可能，因此，須利用多基因類緣分析以進一步確認炭疽菌種類。而分析大量菌株時若使用多基因類緣分析，在定序上所需之成本甚高。為此，在大量鑑定炭疽菌之種時，有些研究者先以 GAPDH 序列將菌株分群，再以分群中部分菌株進行多基因類緣分析，進一步確認該群菌株所屬之種 (Lima *et al*. 2013; Fuentes-Aragón *et al*. 2020)。Sharma *et al*. (2017) 對酪梨炭疽菌的研究中亦顯示，以 ApMat 所建構之類緣樹與 ACT、CAL、ITS、GAPDH、glutamine synthetase 及 TUB 等 6 個基因部分片段串聯後建構之類緣樹有高度相似性。本研究中亦曾初步以 ITS 進行分群，結果發現共同分析之已知菌株中，不同種間之菌株常被歸於同一分支，例如 *C. fructicola*、*C. siamense*、*C. tropicale* 及 *C. theobromicola* 多個菌株被歸於同一分支 (clade)，或雖有分支區隔但分支之 bootstrap 值甚低 (< 50%)，無法進行具可信度之分群 (資料未顯示)。故後續以 ApMat 序列為依據，對 *C. gloeosporioides* 複合種下之菌株進行分群，而 *C. boninense* 複合種之菌株則因無 ApMat 序列，改以 GAPDH 進行初步分群。除了 ApMat 及 GAPDH 序列外，CAL 及

TUB 之基因片段含有多個內轉錄間隔區，在演化上易出現較大的分歧，可提供較多資訊，亦有潛力作為炭疽菌在初步分群上所使用之基因片段。

本研究中對各個園區之調查，可發現 7 個咖啡園的 *Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 以及炭角菌科真菌的比例差異頗大，其中 *Phyllosticta* spp. 及炭角菌科真菌在南投仁愛及嘉義中埔之分離率為 0。另外，在分析嘉義中埔、嘉義竹崎及南投仁愛 3 個咖啡園的內生炭疽菌時，也發現其種類及分離頻度有極大的歧異。究其差異產生的原因，可能與植株所生長之氣候因子，例如溫度、濕度或降雨等相關，也可能與栽培管理方法有關，或受到鄰近作物相影響所致。Oliveira *et al*. (2014) 曾比較慣行和有機咖啡園的內生真菌差異，發現慣行園分離頻度最高的是 *C. gloeosporioides* 複合種，而有機園分離頻度最高的則是 *P. capitalensis*，此外濕季分離到的內生菌數量較多，然而多樣性則是乾季時最高。另一研究調查台灣山區不同海拔高度的森林內生菌，發現內生菌的多樣性受到海拔高度的影響，內生菌菌相的組成，則受寄主、植被種類的影響 (Huang 2020)。本研究中所調查的 3 個園區，嘉義中埔、南投仁愛 2 園區的海拔高度，約為 200 m 及 700 m，而嘉義竹崎的園區位於近阿里山之石桌地區，該處約在海拔 1,300 m 高處，近山區冷涼區域。從調查結果中，嘉義中埔及南投仁愛的內生炭疽菌之菌相也較接近，皆有 *C. cordylinicola*、*C. fructicola* 及 *C. siamense*，且 *C. cordylinicola* 所占比例較高，推測此種菌相上的差異，或許可能跟 3 地的海拔高度及溫度、濕度等天氣因子相關，然而仍需有更多咖啡園之分析結果，以確認其相關性。

本篇報告所報導之 9 個已知種的內生炭疽菌，除了 *C. jianxiense* 及 *C. cordylinicola* 外，其餘 7 個已知種皆有造成咖啡病害的紀錄。例如越南的咖啡炭疽病原菌有 *C. boninense* 及 *C. gloeosporioides* (Nguyen *et al*. 2010)，可在咖啡果實上造成壞疽斑；泰國則有 *C. siamense* 及 *C. fructicola* 為咖啡果實炭疽病病原菌 (Prihastuti *et al*. 2009)；墨西哥的報導指出 *C. karstii*、*C. siamense* 及 *C. theobromicola* 可造成咖啡葉片壞疽 (Cristóbal-Martínez *et al*. 2017)。波多黎各則報導 *C. fructicola*、*C. siamense*、*C. theobromicola* 及 *C. tropicale* 可造成咖啡果實腐爛，且孢子可能經由咖啡果小蠹進行傳播。本研究中之咖啡葉內生菌，雖與造成病害之病原菌為同種，但未在咖啡葉上造成病徵，作為內生菌，此類炭疽菌存在之可能性有 3 種，其一是病原性極弱之機會性病菌，平時潛伏於寄主體內，待寄主生理狀況衰弱時轉為病原菌進行侵染，其二可能是對寄主幾乎沒有任何影響的片利共生，其三則是對寄主有益，可能為具有拮抗菌的潛力，或有幫助寄主抵抗逆境之能力。此外，*C. cordylinicola* 與 *C. jianxiense* 尚無在咖啡上造成病害之報導，但已知 *C. cordylinicola* 會造成朱蕉 (Sharma *et al*. 2014) 及蓮霧 (Phoulivong *et al*. 2011) 的炭疽病，*C. jianxiense* 可造成茶花 (Liu *et al*. 2015) 及酪梨 (Fuentes-Aragón *et al*. 2020) 之炭疽病。由於咖啡炭疽菌為普遍存在咖啡植株之內生菌，未來在探究咖啡葉片相關病害時，應審慎進行病原性測定並排除此些內生真菌之干擾。

植物內生菌可能具有拮抗病原菌的能力，或者具有幫助植物抵抗逆境或促進生長等功能。在咖啡內生菌拮抗病原菌的研究上，Bongiorno *et al*. (2016) 亦從咖啡葉片中分離出高比例的內生炭疽菌，且從菌絲抑制試驗中，發現有些內生性的炭疽菌可抑制病原性的炭疽菌。Monteiro *et al*. (2017) 則是篩選具揮發性有機物質 (volatile organic compounds; VOCs) 的咖啡內生菌，結果發現 *Muscodor coffeanum*、*Muscodor vitigenus*、*Muscodor yucatanensis* 及 *Simplicillium* sp. 產生之 VOCs 可抑制多種病原菌，例如抑制 *Botrytis cinerea*、*Fusarium solani*、*Fusarium verticillioides* 及 *C. coffeicola* 之菌絲生長，其中 *M. coffeanum* 的 VOCs 更可抑制 *C. coffeicola* 侵染咖啡果實。另一研究篩選可抗咖啡銹病菌 *H. vastatrix* 之內生菌，結果顯示數株內生細菌 *Brevibacillus choshinensis*、*Salmonella enterica*、*Bacillus megaterium*、*Microbacterium testaceum*、*Cedecea davisae* 噴施在幼苗上可以有效降低咖啡銹病的嚴重度，且部分菌株具有促進咖啡生長的功

能 (Silva *et al*. 2012b)。種種研究顯示，許多咖啡內生菌確實有成為病害拮抗菌的潛力。另外，*Colletotrichum* spp. 除了具有拮抗菌的潛力外，也可能促進植物生長。阿拉伯芥根部內生菌的研究中，發現炭疽菌 *Colletotrichum tofieldiae* 可協助植物根部吸收磷元素，以促進其生長 (Hiruma *et al*. 2016)。

本研究調查了 7 個咖啡園區之內生菌，瞭解台灣咖啡園主要的內生菌種類，並發現咖啡葉片內生炭疽菌之多樣性。研究中，發現內生炭疽菌種類豐富，未來進行之研究，可持續對不同咖啡園之內生炭疽菌進行調查，以瞭解是否有更多不同種類，或其多樣性是否與栽培條件相關，而對於已分離保存之菌株，則可進一步確認其是否對咖啡具潛在之病原性，或進行咖啡葉片相關病害之病原菌拮抗試驗，探討這些內生菌未來是否具有咖啡病害生物防治應用之潛力。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所張淑芬副研究員、王泰權助理研究員、陳柏宏助理研究員協助樣本收集，助理蔡佳達先生協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kyllo, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins, and E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. PNAS 100:15649–15654. doi:10.1073/pnas.2533483100

Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. APS Press. St. Paul, MN. 218 pp.

Bongiorno, V. A., S. A. Rhoden, A. Garcia, J. C. Polonio, J. L. Azevedo, J. O. Pereira, and J. A. Pamphile. 2016. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. Ann. Microbiol. 66:855–865. doi:10.1007/s13213-015-1168-0

Cannon, P. F., U. Damm, P. R. Johnston, and B. S. Weir. 2012. *Colletotrichum*: Current status and future directions. Stud. Mycol. 73:181–213. doi:10.3114/sim0014

Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553–556. doi:10.1080/00275514.1999.12061051

Chang, S. F., H. R. Yang, J. C. Liu, and M. Y. Lin. 2011. Culture Management of Coffee. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan. 37 pp. (in Chinese)

Cristóbal-Martínez, A. L., M. Yáñez-Morales, R. Solano-Vidal, O. Segura-León, and A. Hernández-Anguiano. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. Eur. J. Plant Pathol. 147:605–614. doi:10.1007/s10658-016-1029-0

Crouch, J. A., B. B. Clarke, and B. I. Hillman. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. Mycologia 101:648−656. doi:10.3852/08-231

Damm, U., J. H. C. Wouldenberg, P. F. Cannon, and P. W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Divers. 39:45–87.

Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, and P. W. Crous. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud. Mycol. 73:37–113. doi:10.3114/sim0010

Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, Y. P. Tan, R. G. Shivas, and P. W. Crous. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. Stud. Mycol. 73:1–36. doi:10.3114/sim0002

Debbab, A., A. H. Aly, and P. Proksch. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. Fungal Divers. 49:1–12. doi:10.1007/s13225-011-0114-0

De Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. IMA Fungus 10:8. doi:0.1186/s43008-019-0001-y

Fuentes-Aragón, D., H. V. Silva-Rojas, V. Guarnaccia, J. A. Mora-Aguilera, S. Aranda-Ocampo, N. Bautista-Martínez, and D. Téliz-Ortíz. 2020. *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. Pl. Pathol. 69:1513–1528. doi:10.1111/ppa.13234

Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323–1330.

doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995

Hiruma, K., N. Gerlach, S. Sacristán, R. T. Nakano, S. Hacquard, B. Kracher, U. Neumann, D. Ramírez, M. Bucher, R. J. O'Connell, and P. Schulze-Lefert. 2016. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. Cell 165:464–474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028

Huang, Y. L. 2020. Effect of host, environment and fungal growth on fungal leaf endophyte communities in Taiwan. J. Fungi 6:244. doi:10.3390/jof6040244

Jayawardena, R. S., C. S. Bhunjun, K. D. Hyde, E. Gentekaki, and P. Itthayakorn. 2021. *Colletotrichum*: Lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. Mycosphere 12:519–669. doi:10.5943/mycosphere/12/1/7

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404

Lima, N. B., M. V. de A. Batista, M. A. de Morais, M. A. G. Barbosa, S. J. Michereff, K. D. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. Fungal Divers. 61:75–88. doi:10.1007/s13225-013-0237-6

Liu, F., B. S. Weir, U. Damm, P. W. Crous, Y. Wang, B. Liu, M. Wang, M. Zhang, and L. Cai. 2015. Unraveling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: Employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. Persoonia 35:63–86. doi:10.3767/003158515X687597

Ma, X., S. Nontachaiyapoom, R. S. Jayawardena, K. D. Hyde, E. Gentekaki, S. Zhou, Y. Qian, T. Wen, and J. Kang. 2018. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. MycoKeys 43:23–57. doi:10.3897/mycokeys.43.25081

Manamgoda, D. S., D. Udayanga, L. Cai, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. Fungal Divers. 61:107–115. doi:10.1007/s13225-013-0256-3

Monteiro, M. C. P., N. M. Alves, M. V. de Queiroz, D. B. Pinho, O. L. Pereira, S. M. C. de Souza, and P. G. Cardoso. 2017. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. Biosci. J. 33:381–389. doi:10.14393/BJ-v33n2-34494

Nguyen, P. T. H., O. V. Pettersson, P. Olsson, and E. Liljeroth. 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. Eur. J. Plant Pathol. 127:73–87. doi:10.1007/s10658-009-9573-5

O'Donnell, K. and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol. Phylogenet. Evol. 7:103–116.

Oliveira, R. J. V., R. G. Souza, T. E. F. Lima, and M. A. Q. Cavalcanti. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. Mycosphere 5:523–530. doi:10.5943/mycosphere/5/4/4

Phoulivong, S., L. Cai, N. Parinn, H. Chen, K. A. Abd-Elsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2011. A new species of *Colletotrichum* from *Cordyline fruticosa* and *Eugenia javanica* causing anthracnose disease. Mycotaxon 114:247–257. doi:10.5248/114.247

Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Divers. 39:89–109.

Ramakuwela, T., J. Hatting, C. Bock, F. E. Vega, L. Wells, G. N. Mbata, and D. Shapiro-Ilan. 2020. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoinensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. Biol. Control 140:104102. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104102

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029

Saikkonen, K., S. Saari, and M. Helander. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? Fungal Divers. 41:101–113. doi:10.1007/s13225-010-0023-7

Santamaría, J. and P. Bayman. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). Microb. Ecol. 50:1–8. doi:10.1007/s00248-004-0002-1

Sharma, G., N. Kumar, B. S. Weir, K. D. Hyde, and B. D. Shenoy. 2013. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: A case study with *Mangifera indica*. Fungal Divers. 61:117–138. doi:10.1007/s13225-013-0247-4

Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. Sci. Rep.

7:15839. doi:10.1038/s41598-017-15946-w

Sharma, K., E. Goss, and A. H. C. van Bruggen. 2014. Isolation and identification of the fungus *Colletotrichum cordylinicola* causing anthracnose disease on *Cordyline fruticosa* in Florida. HortScience 49:911–916. doi:10.21273/HORTSCI.49.7.911

Silva, D. N., P. Talhinhas, V. Várzea, L. Cai, O. Paulo, and D. Batista. 2012a. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycologia 104:396–409. doi:10.3852/11-145

Silva, H. S. A., J. P. L. Tozzi, C. R. F. Terrasan, and W. Bettiol. 2012b. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. Biol. Control 63:62–67. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.06.005

Suryanarayanan, T. S. 2013. Endophyte research: Going beyond isolation and metabolite documentation. Fungal Ecol. 6:561–568. doi:10.1016/j.funeco.2013.09.007

Suryanarayanan, T. S., N. Thirunavukkarasu, M. B. Govindarajulu, and V. Gopalan. 2012. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. Fungal Divers. 54:19–30. doi:10.1007/s13225-012-0168-7

Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225–230. doi:10.1016/0378-1119(92)90055-T

Tzean, S. S., K. C. Tzean, C. A. Chang, T. T. Tsai, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Vaidya, G., D. J. Lohman, and R. Meier. 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27:171–180. doi:10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x

Varma, P. K., S. Uppala, K. Pavuluri, K. J. Chandra, M. M. Chapala, and K. V. K. Kumar. 2017. Endophytes: Role and functions in crop health. p.291–310. *in*: Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives Vol.1: Fundamental Mechanisms, Methods and Functions. (Singh, D. P., H. B. Singh, and R. Prabha, eds.) Springer. Singapore. 657 pp. doi:10.1007/978-981-10-5813-4_15

Vega, F. E., A. Simpkins, M. C. Aime, F. Posada, S. W. Peterson, S. A. Rehner, F. Infante, A. Castillo, and A. E. Arnold. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecol. 3:122–138. doi:10.1016/j.funeco.2009.07.002

Vieira, W. A. S., S. J. Michereff, M. A. de Morais Jr., K. D. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. Fungal Divers. 67:181–202. doi:10.1007/s13225-014-0293-6

Wang, H., M. Qi, and A. J. Culter. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucl. Acids Res. 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153

Wang, Y. C., X. Y. Hao, L. Wang, B. Xiao, X. C. Wang, and Y. J. Yang. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in China. Sci. Rep. 6:35287. doi:10.1038/srep35287

Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73:115–180. doi:10.3114/sim0011

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., J. J. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press, San Diego, CA. 482 pp.

Study of Endophytic *Colletotrichum* spp. in Coffee Leaves in Taiwan

Chao-Jung Wu[1], Sui-Li Hsu[2], Su-Yu Lai[2], Miao-Chun Lin[2], and Hui-Fang Ni[3,*]

Abstract

Wu, C. J., S. L. Hsu, S. Y. Lai, M. C. Lin, and H. F. Ni. 2022. Study of endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):243–266.

In this study, healthy coffee leaves from seven coffee orchards were collected. The seven orchards were located in different areas, namely Ren-ai Township, Nantou County, Gukeng Township, Yunlin County, Chiayi Agricultural Experiment Station, Jhongpu, and Zhuqi Township, Chiayi County, Dongshan District, Tainan City, and Taiwu Township, Pingtung County. Coffee leaves were surface-disinfected and incubated on acidified potato dextrose agar to obtain endophytic fungi. *Colletotrichum* spp., *Phyllosticta* spp. and Xylariaceous fungi were isolated from these seven orchards with a high frequency, and *Colletotrichum* spp. were the most frequently isolated fungi in six of the seven orchards. According to the results of phylogenetic analysis based on actin, calmodulin, chitin synthase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β-tubulin sequences constructed by Bayesian inference, the endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves contained nine species belonging to *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, namely *Colletotrichum cordylinicola*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum jiangxiense*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum theobromicola*, *Colletotrichum tropicale* and an unknown new *Colletotrichum* sp., and two *Colletotrichum boninense* complex species, *C. boninense* and *Colletotrichum karstii*. Isolation frequency and species composition of endophytic *Colletotrichum* spp. from three orchards were compared. The *Colletotrichum* spp. composition of the orchard located in Ren-ai Township, Nantou County resembled that located in Jhongpu Township, Chiayi County. The isolation frequencies of *C. cordylinicola* were 83% and 27% in orchards of Ren-ai and Jhongpu, respectively. *C. siamense* was also isolated from both of the two orchards. In contrast, no *C. cordylinicola* or *C. siamense* was isolated from the orchard in Zhuqi Township, Chiayi County. The most frequently isolated *Colletotrichum* spp. in Zhuqi orchard were *C. fructicola* (45%) and *C. karstii* (45%). The result suggested that endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves are highly diverse, and the fungal composition is different among orchards. This is the first intensive study of endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves using multi-locus sequence analysis to resolve the species, and the result provides information for further study on coffee pathogen or endophyte.

Key words: Coffee, Endophyte, *Colletotrichum* spp.

Received: October 4, 2021; Accepted: March 18, 2022.
* Corresponding author, e-mail: hfni@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow and Division Director, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(3):267–279 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202209_71(3).0006 研究報告

土壤微生物擴增子定序物種分類指派策略之研究

陳涵葳[1] 林美君[2] 林素禎[3] 曾清山[4] 杜元凱[1,*]

摘要

陳涵葳、林美君、林素禎、曾清山、杜元凱。2022。土壤微生物擴增子定序物種分類指派策略之研究。台灣農業研究 71(3):267–279。

應用 16S rRNA 基因擴增子定序進行土壤微生物物種 DNA 條碼鑑定，是近年微生物群落的研究趨勢，是一種高通量、標準化的方法學。DADA2 是適合 Illumina 定序平台使用的新一代分裂擴增子降噪演算法，可提供高解析的擴增子序列變體 (amplicon sequence variants; ASVs) 資料，如何連結微生物二名法與高解析資料，對土壤微生物群落後續分析顯得更加重要。本研究使用 DADA2 套件處理土壤樣品定序資料，比較 3 種不同的物種分類指派 (taxonomic assignment) 流程，結果顯示 DADA2 套件內件之 assignTaxonomy 指令搭配包含菌種名的 SILVA 138 參考序列訓練集 (training set)，有最好的物種分類指派效能。另以二元分類法評估 DADA2 套件適用的 SILVA 138、SILVA 138.1、GTDB 與 RefSeq + RDP 參考序列訓練集，對土壤微生物物種分類指派之效能，研究顯示 GTDB 訓練集敏感度最高，SILVA 138 與 SILVA 138.1 訓練集具有最佳特異性，而 RefSeq + RDP 訓練集物種分類指派結果之正確率、正確覆蓋率、馬修斯相關係數、陽性預測率指標均高於其他訓練集。微生物多樣性分析結果則顯示，GTDB 訓練集之物種分類指派結果最貼近原始 ASVs 資料，最能反應真實土壤微生物群落狀況。本研究揭示物種分類指派流程與參考序列訓練集的選擇，對微生物物種鑑別有很大的影響，隨著 16S rRNA 基因參考序列資料庫不斷地更新，更應該謹慎選擇與反覆評估，才能更準確的描述微生物間的多樣性關係。

關鍵詞：土壤微生物、16S rRNA 基因擴增子定序、DNA 條碼、DADA2。

前言

微生物群落之功能、交互作用與其變動性對生態平衡至關重要 (Zhou *et al*. 2015)，土壤是一個複雜且動態的生態系統，每克土壤中約有 10^6–10^7 種細菌、真菌或古生菌，但由於培養基和培養條件的限制，目前可培養分離的微生物僅占估計數量的 1–5% (Amann & Ludwig 2000)。隨著次世代定序技術的發展，原核生物核糖體小亞基 (ribosomal small subunit) 之 16S rRNA 基因序列分析已經是公認的細菌分類鑑定方法 (Pace 1997)，16S rRNA 基因全長約 1.6 kb，可分為 9 個高度變異區 (V1–V9)，已知 V3 與 V4 變異速度快，適合進行菌種層級之判定 (Mizrahi-Man *et al*. 2013)，利用引子增幅 16S rRNA 基因特定區域後進行擴增子定序 (amplicon sequencing)，是近年研究微生物群落系統發生和分類的趨勢。根據特定片段 DNA 序列進行物種分類的方法，也稱 DNA 條碼 (DNA barcoding) 鑑定，對於物種豐度較高的環境，如土壤細菌、海洋浮游生物……等研究，提供一個高通量、標準化的方法學，可落實大尺度或全球性的物種普查，如參考土壤宏基因體計畫 (reference soil metagenome pro-

投稿日期：2021 年 11 月 9 日；接受日期：2022 年 5 月 30 日。
[*] 通訊作者：yktu@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

ject) (Vogel *et al*. 2009)、地球微生物體計畫 (the earth microbiome project; EMP) (Gilbert *et al*. 2010)、中國土壤微生物體倡議 (China soil microbiome initiative; CSMI) (Wang *et al*. 2021) 等。土壤微生物體學的技術的發展，從傳統型態辨識走向高通量定序、生物資訊與大數據分析，要連結 DNA 序列與環境生態，必須提高微生物物種分類解析度 (taxonomic resolution)，可從擴增子序列分類方法以及 16S rRNA 基因參考資料庫之選擇兩方面著手。

擴增子序列分類方法包括：操作分類單元 (operating taxonomic units; OTU) 與擴增子序列變體 (amplicon sequence variant; ASV) 兩種。OTU 分析主要是利用聚類法 (clustering)，如 97% 相似性聚類法、無參考序列 OTU 聚類法 (reference-free OTU clustering)、封閉參考 OTU 聚類法 (closed-reference OTU clustering) ……等；缺點為運算資源過大、虛假 OTU 產生、無法辨識參考序列外之物種等 (Callahan *et al*. 2017)。ASV 分析法與 OTU 聚類的概念相反，以分裂分配演算法 (divisive partitioning algorithm) 進行讀序分析，如分裂擴增子降噪演算法 (divisive amplicon denoising algorithm; DADA)，結合讀序豐度校正錯誤率，有效降低偽陽性誤判 (Rosen *et al*. 2012)，而 DADA2 是適用於 Illumina 定序平台的降噪演算法 (Callahan *et al*. 2016)，其他 ASV 演算法套件如 Deblur (Amir *et al*. 2017)、UNOISE3 (Edgar 2016) 等。DADA2 較 Deblur、UNOISE3 有更高的靈敏度和分辨率，是目前擴增子讀序資料分析套件中最適合進行菌種層級分辨的 (Callahan *et al*. 2019; Prodan *et al*. 2020)。常用的 16S rRNA 基因資料庫包括核糖體資料庫計畫 (Ribosomal database project; RDP) (Cole *et al*. 2014)、SILVA 資料庫 (Quast *et al*. 2012)、GreenGenes 資料庫 (DeSantis *et al*. 2006)、RefSeq 資料庫 (O’Leary *et al*. 2016)，以及 GTDB 資料庫 (Parks *et al*. 2020)。由於 DADA2 演算法能產生極高分辨率的 ASVs 資料，倘若無法正確連結微生物二名法，這樣高解析的資料便失去其意義 (Curry *et al*. 2018)。本研究使用 DADA2 套件處理土塊、旱田、水田 3 種土壤樣品定序資料，比較不同指令對土壤微生物物種分類指派的效能，評估 SILVA 138、SILVA 138.1、GTDB 與 RefSeq + RDP 等 4 個符合 DADA2 格式之參考序列訓練集，於 ASV 分析流程的適用性，期望能建立最適合的分析方法，提升土壤微生物群落分析之正確性。

材料與方法

土壤樣本收集

本研究收集行政院農業委員會農業試驗所之試驗田區土壤，包括長期種植水稻之水田 (paddy field; PF)、長期種植果樹之旱田 (dry field; DF)，以及旱田周邊沒有植物根系穿越之土塊 (bulk soil; BS)，每種性質的土壤有 6 個土壤樣品 (n = 6)，共計 18 份土壤樣品，而每份土壤樣品是由 3 個採土點土面下 15 cm 之 100 g 土壤混合而成，於室溫下風乾後以 2 mm 篩網過濾去除植物殘體與碎石，之後立即進行土壤 DNA 萃取。

土壤樣本 DNA 萃取與建庫

秤取 0.3 g 土壤樣品萃取土壤 DNA，使用 Power Soil 土壤 DNA 純化試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany)，依照使用說明進行 DNA 純化。所得 DNA 經微量分光光度計 (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 測定濃度與純度，再以 1% 洋菜膠體電泳確認 DNA 完整性後，以無菌水將 DNA 稀釋成 1 ng μL^{-1} 後保存 -20℃。利用細菌 16S rRNA 基因 V3–V4 區域通用引子對 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG)/805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) 進行增幅反應，每個 polymerase chain reaction (PCR) 反應總體積為 25 μL，其中包含 1 ng 土壤 DNA、0.5 μM 正向引子與反向引子、0.5 μL High-Fidelity PCR Master Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)。PCR 反應條件為 95℃ 3 min；95℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 30 s，循環 30 次；72℃ 5 min。PCR 產物經 2% 洋菜膠體電泳確認後，以 QIAquick 膠體回收試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany) 回收 450–500 bp 片段，再以 Qubit 2.0 螢光定量系統進行 DNA 片段定量 (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。DNA 文庫使用 Truseq nano DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 依原廠建議步驟進行構築。DNA 文庫於 Illumina MiSeq 平台上進行定序，生成 2 × 300 bp 雙端讀序資料。

讀序分析流程

所有 MiSeq 讀序資料都在 R (版本 4.1.0) 環境下，以 DADA2 (版本 1.16) 套件生成 ASVs 資料。讀序處理流程參照 Callahan *et al*. (2016) 之建議，匯入 *.fastq.gz 格式之讀序資料，以 removePrimers 指令去除讀序內引子序列；使用 filterAndTrime 指令進行序列過濾，設定 truncLen = c (240, 160)，對正向讀序與反向讀序分別裁剪至 240 bp 和 160 bp，因為 Illumina 平台中反向序列品質明顯較差，故而剪裁至 160 bp 以保留較高品質的序列，設定 maxEE 參數調整序列之錯誤期望值極大值；使用 learnErrors 指令隨機擷取參考樣本交替估算錯誤率，推斷樣品組成直到收斂；以 derepFastq 指令，將具有相同序列的擴增子讀序重新分配形成單一序列，提高處理效能；使用 dada 指令將樣品內的單一序列進行分裂分配，在此更改 pool 參數為 TRUE，將所有樣品的單一序列進行分裂分配，可以提高極低豐度序列的敏感度；輸入 mergePairs 指令，比對正向與反向互補序列，預設 minOverlap = 12 而 maxMismatch = 0，接著以 makeSequenceTable 指令生成高解析度的 ASVs 資料，再以 removeBimeraDenovo 指令進行比對，移除雙源嵌合體 (bimera)。

物種分類指派流程 (pipeline)

流程 1 (pipeline_1)：下載並載入 DECIPHER (版本 2.6.0) 套件適用之 SILVA 138 參考序列訓練集 (http://www2.decipher.codes/Classification/TrainingSets/SILVA_SSU_r138_2019.RData)，輸入 IdTaxa 指令並確認參數 strand = “both”，即可進行物種比對。流程 2 (pipeline_2)：下載並載入 DADA2 套件適用的 SILVA 138 參考序列訓練集 (包含菌種種名) (https://zenodo.org/record/3986799/files/silva_nr99_v138_wSpecies_train_set.fa.gz?download=1)，輸入 assignTaxonomy 指令，將 tryRC 參數之設定改為 TRUE，進行物種比對。流程 3 (pipeline_3)：下載 SILVA 138 參考序列訓練集 (https://zenodo.org/record/3986799/files/silva_nr99_v138_train_set.fa.gz?download=1)，將訓練集載入 DADA2 套件後，輸入 assignTaxonomy 指令並更改 tryRC 參數為 TRUE，進行物種比對；下載 SILVA 138 二名法參考訓練集 (https://zenodo.org/record/3986799/files/silva_species_assignment_v138.fa.gz?download=1)，載入 DADA2 並以 addSpecies 指令添加菌種種名。

參考序列訓練集效能評估

為評估參考序列訓練集於高解析 ASVs 資料的適用性，於 DADA2 網站 (https://benjjneb.github.io/dada2/training.html) 下載了 4 個 16S rRNA 基因參考序列訓練集 (皆包含菌種種名)，分別為：SILVA 138 (2020 年 8 月 15 日發布)、SILVA 138.1 (2021 年 3 月 7 日發布)、GTDB (2020 年 4 月 28 日發布)、RefSeq + RDP (2020 年 6 月 11 日發布)。使用前述流程 2 步驟進行物種分類指派。參考 Escobar-Zepeda *et al*. (2018) 的策略，以二元分類測試法評估不同參考序列訓練集的分類效能；為取得菌種分類之「參考值」，參照 McClenaghan *et al*. (2020) 的分析流程，選取土壤樣品豐度排序前 250 名之 ASVs 資料，將序列資料轉為 *.fast 格式，使用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 之 blastn 比對工具 (於 2021 年 8 月 6 日進行比對)，設定 e-value 最低閥值為 0.01，若比對後有 2 個或以上的物種分類指派，則以最低共同分類為分類結果，輸出比對結果作為菌種分類指派的參考值。4 個參考序列訓練集比對結果再與參考值進行比較，若物種分類指派與參考值一致，標註為真陽性 (true positive; *TP*)；若物種分類指派與參考值不一致，標註為偽陽性 (false positive; *FP*)；若參考序列訓練集沒有辦法給予物種分類指派，則標註為偽陰性 (false negative; *FN*)；另加入 100 條隨機序列於 ASVs 資料中，標註為真陰性 (true negative; *TN*)。本研究所使用的效能評估指標計算公式如下：

正確率 (Accuracy; *ACC*)

$$= \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \quad (1)$$

正確覆蓋率 (Coverage; *COV*)

$$= \frac{TP}{TP + FP + FN + TN} \quad (2)$$

馬修斯相關係數 (Matthews correlation coefficient; *MCC*) =

$$\frac{(TP \times TN) - (FP \times FN)}{[(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)]^{1/2}} \quad (3)$$

陽性預測率 (Positive predictive value; *PPV*) =

$$\frac{TP}{TP + FP} \quad (4)$$

真陰性率 (True negative rate; *TNR*)

$$= \frac{TN}{FN + TN} \quad (5)$$

真陽性率 (True positive rate; *TPR*)

$$= \frac{TP}{TP + FN} \quad (6)$$

數據處理與統計分析

土壤樣品之ASVs資料使用vegan套件 (版本2.5.7)、phyloseq套件 (版本1.36.0)、ROCit套件 (版本2.1.1) 進行分析，各項數據以SAS統計分析軟體 (SAS Enterprise Guede 7.1) 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，再以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test)，比較5%顯著水準下各處理間的差異。

結果與討論

讀序處理結果

BS、DF與PF土壤樣品經Illumina MiSeq高通量定序平台取得了651,173、604,447及616,843條原始讀序 (raw reads)，通過DADA2套件removePrimers指令去除16S rRNA基因擴增片段引子序列，約保存99.4%之讀序資料 (表1)，扣除引子後的平均長度為409 bp。以filterAndTrime指令移除品質不佳的讀序，可保留70%過濾讀續 (filtered reads)，BS、DF與PF土壤樣品之組裝讀序 (merged reads) 依序為454,292、397,095與418,949條，經分裂分配演算法得到之ASVs資料量如表1所列，BS土壤樣品之ASVs資料量為2,279，低於DF與PF土壤樣品之ASVs資料量 (表1)。植物根部分泌多種物質，包括碳水化合物、胺基酸、有機酸、二級代謝物……等，根圈附近的微生物較容易獲得養分 (Walker *et al*. 2003)，可以解釋為何沒有植物根系穿過的BS土壤樣品ASVs資料量較低，微生物多樣性少。稀釋曲線 (rarefaction curve) 或豐富度曲線可以反應定序資料量是否足以代表定序樣品的物種多樣性，根據圖1結果顯示，隨著抽樣數量的增加，BS、DF與PF土壤樣品之ASVs數量趨於平緩。

物種分類指派流程之效能評估

比較DECIPHER/IdTaxa、DADA2/assignTaxomomy、DADA2/assignTaxonomy/addSpecies三種分類指派流程進行運算，並以物種分類指派率 (assignment to taxon) 來評估不同流程之物種分類指派效能，流程1的物種分類指派率在門、綱、目、科與屬的層級均較流程2、3為低，顯示DADA2套件的物種分類指派運算效能較DECIPHER套件佳，在門、綱的層級均可達到97%的物種分類指派率 (表2)。流程2與流程3的差別在於是否使用addSpecies步驟添加菌種種名，在門、綱、目、科與屬的層級，兩者沒有差異，但流

表1. 土塊、旱田、水田土壤樣品之原始讀序、過濾讀序、組裝讀序與16S rRNA基因擴增子序列變體數量。

Table 1. The number of raw reads, filtered reads, merged reads and amplicon sequence variants (ASVs) in bulk soils (BS), dry field soils (DF) and paddy field soils (PF).

Method	BS	DF	PF
Raw reads	651,173	604,447	616,843
Filtered reads	479,360	421,824	443,899
Merged reads	454,292	397,095	418,949
ASVs	2,279	4,496	5,665

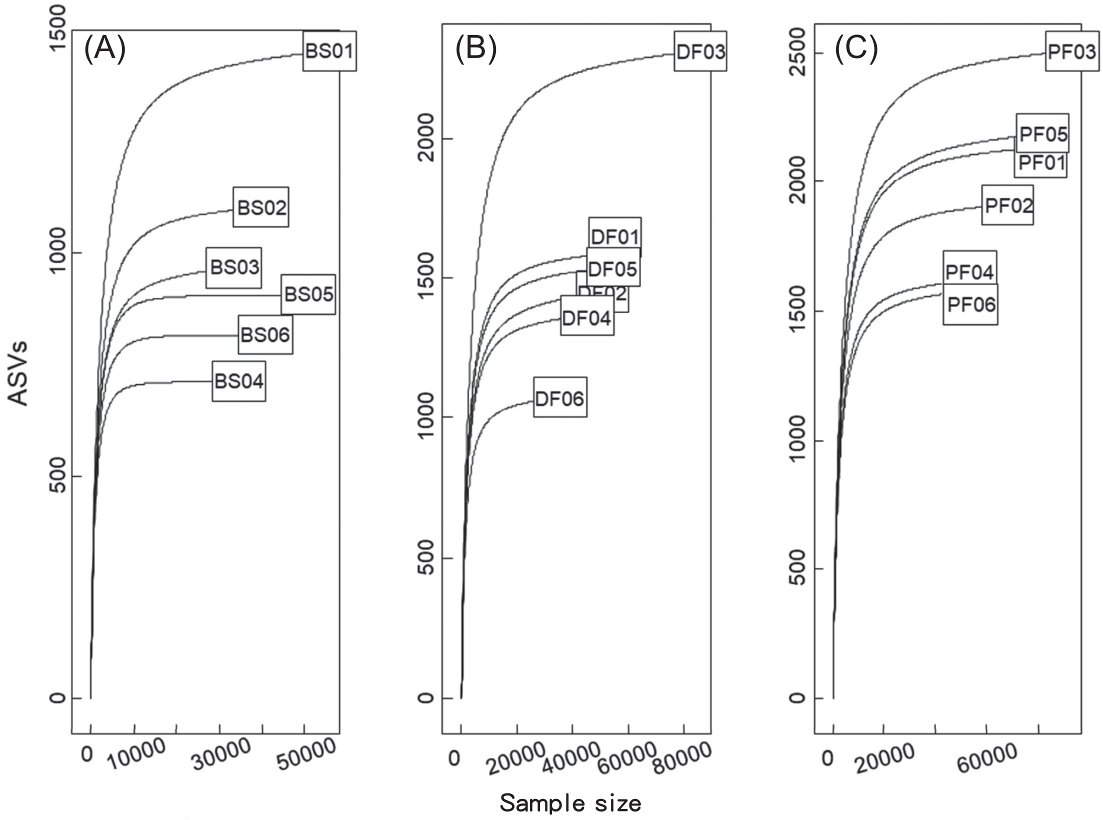

圖 1. 稀釋曲線。(A) 6 個土塊 (bulk soil; BS) 樣品 16S rRNA 基因擴增子序列變體稀釋曲線；(B) 6 個旱田 (dry field; DF) 樣品 16S rRNA 基因擴增子序列變體稀釋曲線；(C) 6 個水田 (paddy field; PF) 樣品 16S rRNA 基因擴增子序列變體稀釋曲線。

Fig. 1. Rarefication curves. (A) Rarefication curves for amplicon sequence variants (ASVs) in 6 bulk soil (BS) samples; (B) rarefication curves for ASVs in 6 dry field (DF) samples; and (C) rarefication curves for ASVs in 6 paddy field (PF) samples.

程 2 在種的層級具有最佳的比對效能，顯示二名法參考序列訓練集與 addSpecies 步驟並不是必要，直接選擇包含菌種種名的參考序列訓練集即可 (表 2)。DADA2 套件使用 RDP 分類器，是建構於單純貝氏分類模型與 Bergey 分類法的機器學習分類 (Callahan *et al*. 2016)，RDP 分類器為了加快比對速度，將序列拆分成 8 bp 一組的 k-mer，適合高通量 rRNA 基因序列分析，但對於較偏離參考序列訓練集的資料，通常會給予可信度較低的分類結果 (Wang *et al*. 2007)，這也是 RDP 分類器常發生過度分類 (over classification) 的原因。流程 1 使用 DECIPHER 套件的 IdTaxa 分類器，能整合系統發育、機器學習和距離特徵等分類法，與 RDP 分類器相比，具有較低的過度分類錯誤率，但在人類腸道微生物定序資料比對結果也顯示，在屬的分類層級上，IdTaxa 能提供的物種分類指派率低於 RDP 分類器 (Murali *et al*. 2018)，這與本研究結果一致 (表 2)。此外，適合 DECIPHER 套件使用的 SILVA 138 參考序列訓練集並不包含種的分類層級，雖然 IdTaxa 分類器整合多種分類方法，具有運算速度快、避免過度分類等優點，但目前沒有完備的參考序列訓練集可供下載使用，是美中不足的地方。本研究建議 ASVs 資料之物種分類指派，仍以 DADA2 套件內建的 assignTaxonomy 指令，搭配使用包含菌種種名的參考序列訓練集 (流程 2)，會有最佳的物種分類指派率。

表 **2.**　不同流程之物種分類指派效能比較。

Table 2.　Comparison with the percentage of taxonomic assignments at different taxonomic ranks using different pipelines.

Taxonomic ranks	Assignment to taxon (%)		
	Pipeline_1[z]	Pipeline_2[y]	Pipeline_3[x]
Kingdom	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a
Phylum	83.23 ± 2.92 b	99.57 ± 0.21 a	99.68 ± 0.19 a
Class	81.24 ± 3.11 b	97.19 ± 0.95 a	97.25 ± 0.88 a
Order	71.72 ± 4.20 b	90.84 ± 1.84 a	90.84 ± 1.91 a
Family	61.19 ± 4.74 b	77.19 ± 3.62 a	76.84 ± 3.75 a
Genus	38.18 ± 4.69 b	51.07 ± 4.75 a	50.37 ± 4.88 a
Species	0.00 ± 0.00 c	11.96 ± 2.81 a	5.92 ± 1.95 b

Data represent mean ± standard error of three replicates. Values in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$) based on Fisher's protected least significant difference test (LSD) test.

[z] Pipeline_1: IdTaxa (DECIPHER) + SILVA 138 training set.

[y] Pipeline_2: assignTaxonomy (DADA2) + SILVA 138 training set (with Species).

[x] Pipeline_3: assignTaxonomy (DADA2) + SILVA 138 training set (without Species) → addSpecies (DADA2) + SILVA 138 training set (Species assignment).

參考序列訓練集物種分類指派效能評估

根據序列進行物種指派的策略包括了序列相似性搜尋、序列組合方法與系統發育方法；序列相似性搜尋是基於序列同源性或比對的方式，如 BLAST，而系統發育方法則是將進化模型應用於資料庫中，尋找目標序列在系統發育中最適合的位置。本研究所評估之 SILVA 138、SILVA 138.1、GTDB 和 RefSeq + RDP 等 4 個符合 DADA2 格式之參考序列訓練集，皆是擷取微生物公共資料庫序列資料的優化版本，以 BLAST 結果作為「參考值」，配合二元分類測試法評估 4 個參考序列訓練集對於土壤微生物物種分類指派之效能。針對屬與種分類階層進行 *ACC*、*COV*、*MCC*、*PPV*、*TNR* 與 *TPR* 等效能評估指標計算，RefSeq + RDP 訓練集在屬的分類層級上，*ACC*、*COV*、*MCC* 與 *PPV* 的表現均顯著優於其他訓練集，在種的分類階層中 RefSeq + RDP 訓練集 *COV* 指標可達 50%，顯示該訓練集具有最大的正確覆蓋率，*ACC* 與 *MCC* 指標表現亦較 SILVA 138、SILVA 138.1 與 GTDB 訓練集佳 (圖 2)。GTDB 訓練集 *TPR* 指標顯著高於其他訓練集，由於 *TPR* 指標也稱敏感性 (sensitivity) 指標，即 GTDB 訓練集在屬與種的分類階層，對絕大部分的 ASVs 都可給予對應的物種指派 (圖 2)。雖然 SILVA 138 與 SILVA 138.1 訓練集在 *ACC*、*COV*、*MCC*、*TPR* 指標雖遜於 RefSeq + RDP 訓練集，但 *TNR* 指標表現最佳，*TNR* 指標也稱特異性 (specificity) 指標，顯示 SILVA 訓練集判定的物種雖少，但所判定的物種大部分與「參考值」一致 (圖 2)。四個參考序列訓練集物種分類指派之特徵曲線 (receiver operating characteristic curve; ROC curve) 分析結果也顯示，RefSeq + RDP 資料集之曲線下面積 (area under curve; AUC) 達 0.85，優於 GTDB、SILVA 138 與 SILVA 138.1 之 0.81、0.78 與 0.71 (圖 3)。綜合二元分類 *ACC*、*COV*、*MCC* 指標與 AUC 檢定結果，本研究之土壤 ASV 數據集使用 DADA2 套件內建的 assignTaxonomy 指令，搭配 RefSeq + RDP 參考序列訓練集，會有最好的物種分類指派效能。GTDB 與 RefSeq + RDP 訓練集的資料節點項數，在屬與種的分類階層遠較 SILVA 訓練集為多 (圖 4)，在物種分類指派效能評估上較占優勢。參考序列資料庫或訓練集的物種命名方法，對於物種分類指派結果也深具影響；GTDB 訓練集在 *PPV* 與 *TNR* 評估指標上表現不佳，主要是因為 GTDB 資料庫是一個完全基於基因體序列建構的分類資料庫，並連接蛋白質系統發育作為細菌分類學的基礎架構，這種新的分類方法可擴大 30% 以上細菌及古生菌多樣性，但有 58% 的序列與

現有物種分配不一致 (Parks *et al*. 2018)，將 GTDB 資料庫與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫共有序列的物種進行比較，約 35.1% 的物種具有不同的命名，主要是因為 GTDB 資料庫採用相對進化分歧 (relative evolutionary divergence) 的策略進行屬分類階層的歸一化，並對不能培養的菌株給與占位名稱 (placeholder names)，變化最多的分類為 *Pseudomonas* 屬、*Bacillus* 屬與 *Lactobacillus* 屬 (Parks *et al*. 2020)，在 *Bacillus* 屬的分類研究中，歸納了 6 個分類進化枝 (phyletic clades)，對應形成 6 個新的屬，包括 *Peribacillus*、*Cytobacillus*、*Mesobacillus*、*Neobacillus*、*Metabacillus* 與 *Alkalihalobacillus*，與 GTDB 資料庫的分組情形一致 (Patel & Gupta 2020)，顯示 GTDB 分類命名基礎上與 NCBI 資料庫雖有較大的差異，但對於不能培養的菌株或是系統發育不連貫的群體 (phylogenetically incoherent group)，提供了新穎且具代表性的物種分類指派。

參考序列訓練集對微生物群落多樣性分析之影響

已知 16S rRNA 基因參考序列資料庫之組成、品質和完整性，決定了 DNA 條碼對物種的鑑別能力，對物種分類指派影響極大 (Park

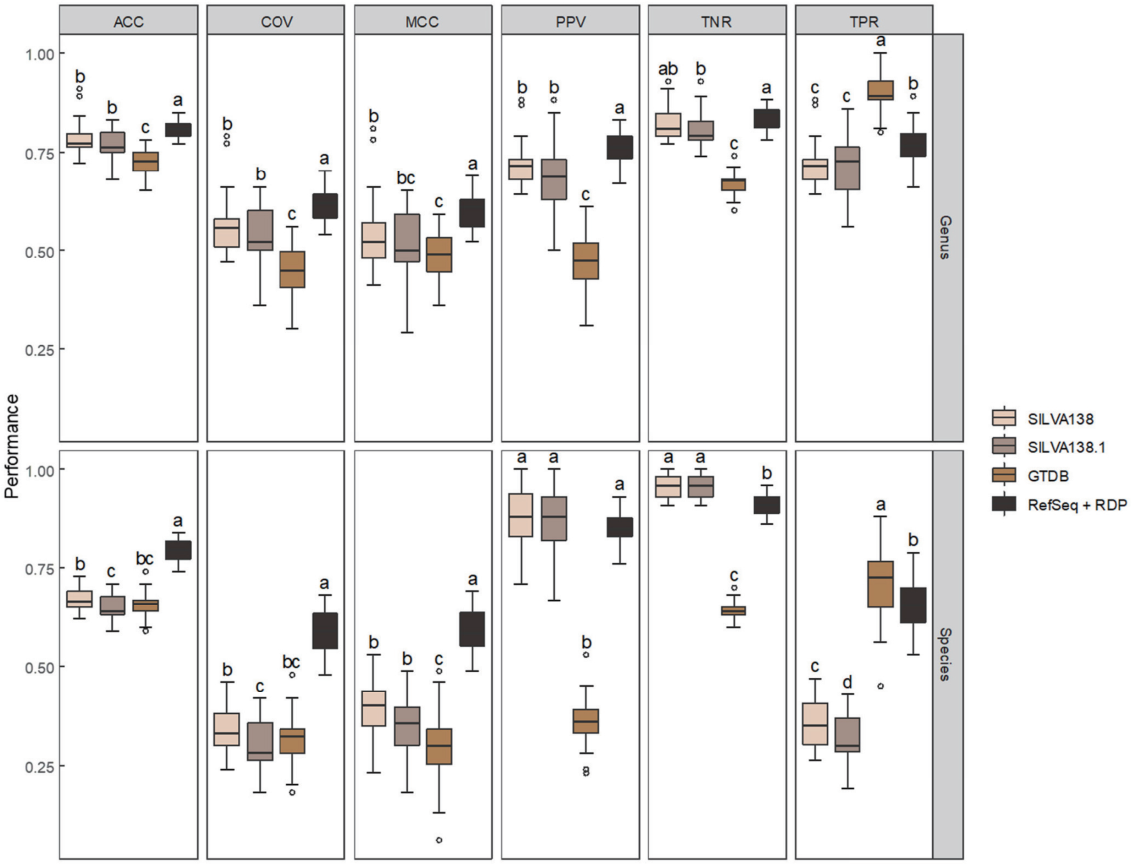

圖 2. 不同參考序列訓練集之效能指標評估。

Fig. 2. Performance descriptors for taxonomic assignments at Genus or Species ranks based on different training sets. Six indicators in terms of accuracy (ACC), coverage (COV), Matthews Correlation Coefficient (MCC), positive predictive value (PPV), true negative rate (TNR), and true positive rate (TPR) were used to describe the performance of taxonomic assignments. Different letters above bars indicate a significant difference based on analysis of variance (ANOVA) test followed by Fisher's protected least significant difference test (LSD) test ($P < 0.05$).

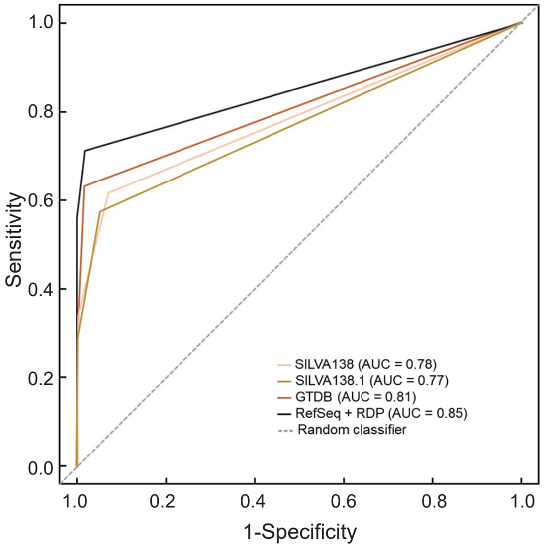

圖 3. 不同參考序列訓練集之特徵曲線評估。

Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) curves for taxonomic assignments of different training sets.

& Won 2018; Henderson *et al*. 2019)。由於 SILVA 138.1 是 SILVA 138 訓練集修正版本，僅修正少部分不確定分類位置 (*incertae sedis*) 與未分類缺失，為維持資料的一致性與可比較性，後續僅保留 SILVA 138、GTDB 和 RefSeq + RDP 三個參考序列訓練集之物種分類指派結果，利用 phyloseq 套件整併相同物種分類指派結果之 ASVs，之後再進行微生物群落多樣性分析，土壤樣品在種的分類階層之 α 多樣性指數箱型圖如圖 5，原始 ASVs 資料中，PF 土壤樣品多樣性最高，其次為 DF 土壤樣品，BS 土壤樣品多樣性最低，但經物種分類指派與整併後，α 多樣性指數降低，SILVA 訓練集之物種分類指派結果在 Chao1、ACE、Shannon、InvSimpson 與 Fisher 等多樣性指數上已無法反應原始情況，GTDB 訓練集之物種分類指派結果較接近原始 ASVs 分析結果。從主座標分析 (principal co-ordinates analysis; PCoA) 雙

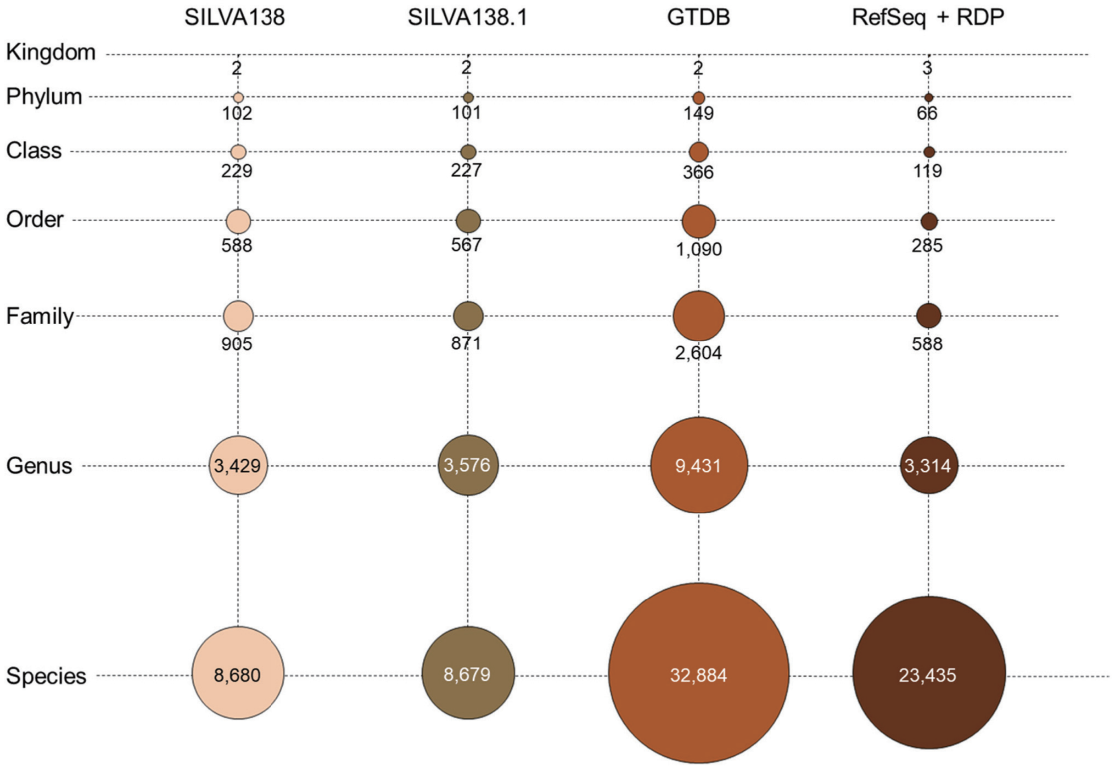

圖 4. 參考序列訓練集資料節點之比較。

Fig. 4. Composition with the number of nodes at each rank. Circle area correspond to the number of nodes at each rank in SILVA 138, SILVA 138.1, GTDB, and RefSeq + RDP 16S rRNA training set.

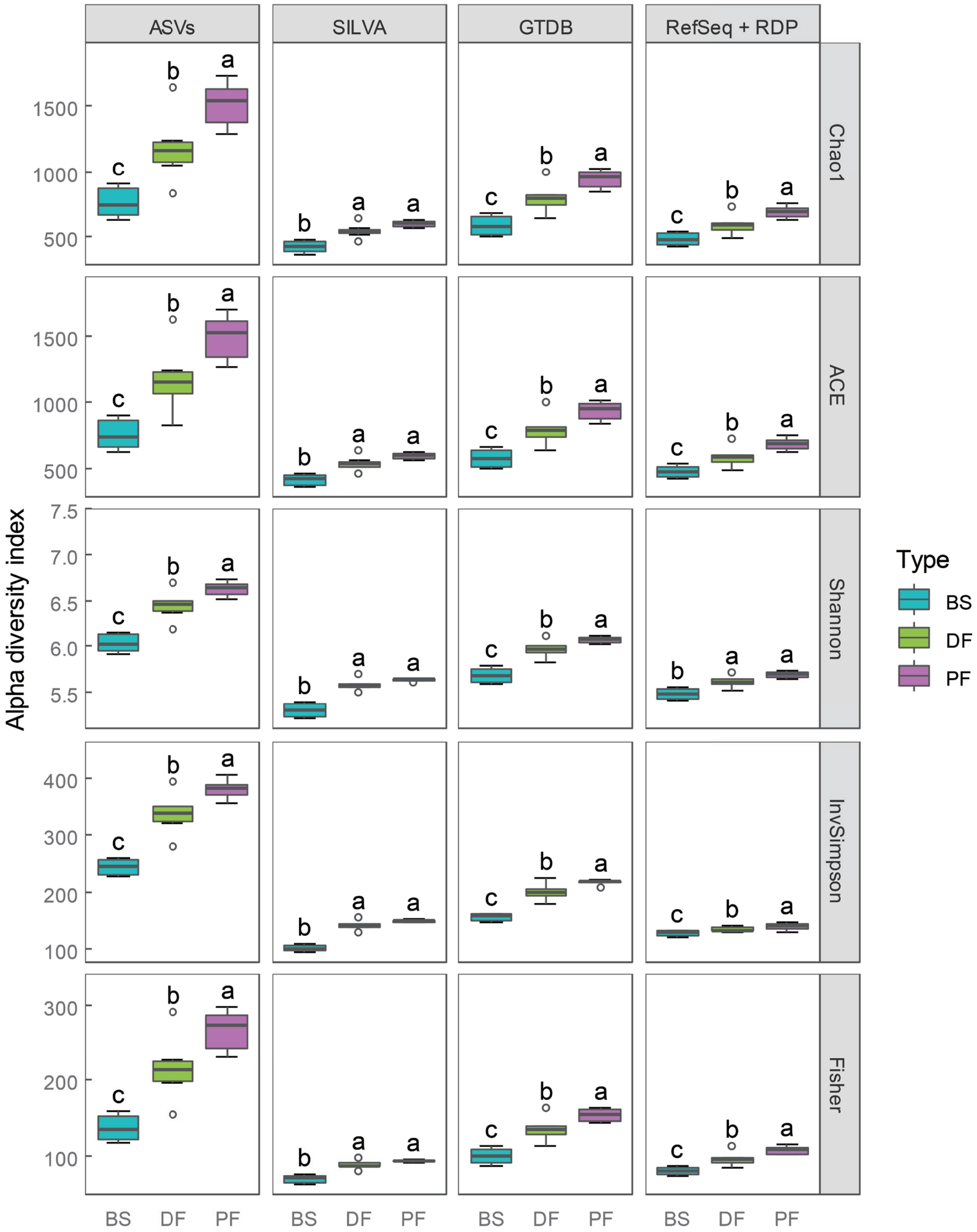

圖 5. 不同參考序列訓練集結果之 α 多樣性。

Fig. 5. α diversity for taxonomic assignments of different training sets. α diversity assessed by Chao1, ACE, Shannon, InvSimpson, and Fisher. Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among bulk soils (BS), dry field soils (DF), and paddy field soils (PF).

標圖 (biplot) 結果可以清楚看到不同訓練集對 β 多樣性的影響 (圖 6)，2,601 筆 ASVs 資料經 SILVA 訓練集進行物種分類指派與整併後，在種的分類階層上僅保留 238 筆資料，樣品分布位置與原始資料具有落差 (圖 6A、E)，而 GTDB 與 RefSeq + RDP 訓練集之物種分類

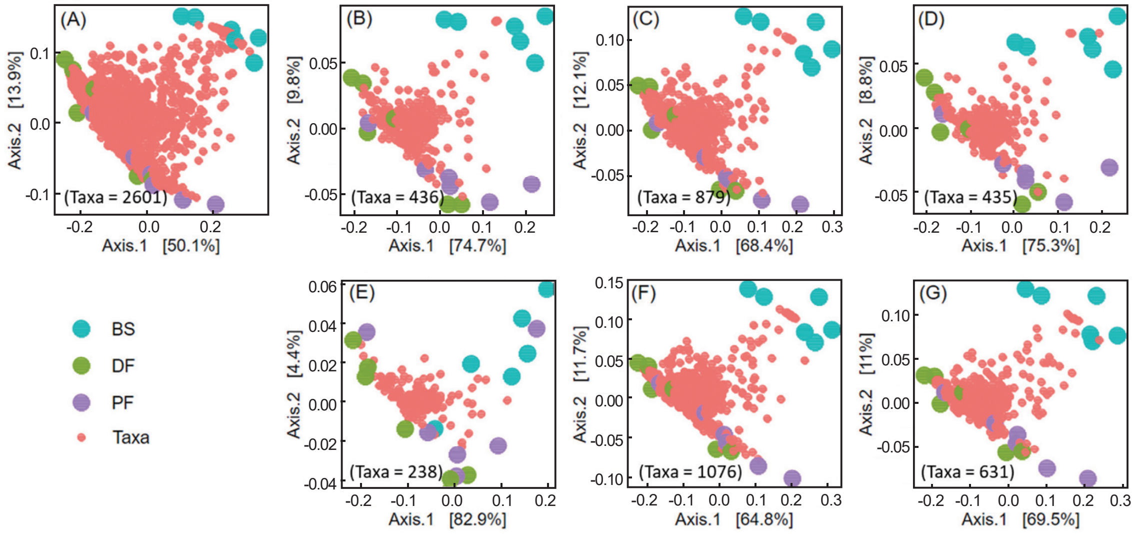

圖 6.　主座標分析雙標圖。土壤樣品依照土塊、旱田、水田給予不同顏色的分群標示。(A) 向量圖型繪製參照原始 ASVs 資料；(B、E) SILVA 138 訓練集物種分類指派結果；(C、F) GTDB 訓練集物種分類指派結果；(D、G) RefSeq + RDP 訓練集物種分類指派結果。(B–D) 為屬的分類階層；(E–G) 為種的分類階層。所有圖形皆依照 Bray-Curtis 相異度進行繪製。

Fig. 6.　Principal co-ordinates analysis (PCoA) plot. The 18 soil samples grouped and colored according to bulk soil (BS), dry field (DF), and paddy field (PF). (A) Ordination biplot were generated by original ASVs data; (B, E) by taxonomic assignment of SILVA 138 training set; (C, F) by taxonomic assignment of GTDB training set; and (D, G) by taxonomic assignment of RedSeq + RDP training set. (B–D) Plots of rank scores at Genus level and (E–G) at Species level. All plots were generated with Bray-Curtis dissimilarity.

指派結果，分別保留 1,076 和 631 筆資料，樣品分布位置與原始資料相當 (圖 6F、G)；在屬的分類階層上，SILVA 138、GTDB 和 RefSeq + RDP 三個訓練集之物種分類指派結果依序為 436、879 與 435，樣品分布位置沒有明顯變化 (圖 6B、C、D)，上述結果顯示在種的分類階層上，以 GTDB 訓練集之物種分類指派結果最貼近原始 ASVs 資料，α 多樣性與 β 多樣性分析結果能反應原始的高解析 ASVs 資料分布；SILVA 訓練集在種的分類階層上，物種分類指派效能不佳，但在屬的分類階層上則與 RefSeq + RDP 訓練集結果相近。SILVA 138 參考序列訓練集選自 SILVA 138 SSU 資料庫，所包含的參考序列資料量為 452,522 筆，大於 GTDB 訓練集之 32,884 筆、RefSeq + RDP 訓練集之 23,589 筆，但 SILVA 138 訓練集包含種名的資料量為 111,122 筆，僅占訓練集資料量之 25%，而 GTDB 與 RefSeq + RDP 訓練集內所有的參考序列資料皆含種名，物種分類資料節點分析也顯示，SILVA 138 訓練集包含種名的資料節點為 8,680 項，遠小於 GTDB 與 RefSeq + RDP 訓練集之節點項數 (圖 4)，這也說明了為何 SILVA 138 訓練集在種的分類階層上無反應高解析 ASVs 資料的物種多樣性。最多人使用的 SILVA 資料庫自 2007 年上線，參考序列的資料量早已超過初始建模的 10 倍以上，Glöckner *et al*. (2017) 建議 SILVA 資料庫應導入不能培養的候選分類單元 (candidate taxonomic unit; CTU) 概念，並重新整合細菌與古生菌序列資料，建構新的系統發育進化樹，增加亞種或菌株的分類層級，解決分類錯誤或是不明確的歸類問題 (Glöckner *et al*. 2017)。隨著高解析 ASV 演算法的開發，通用資料庫已無法精準提供種或更低分類階層的環境微生物物種分類，建構棲地特異性 (habitat-specific) 或棲地專用 (habitat-dedicated) 參考序列訓練集，如瘤胃專用的 RIM-DP (Seedorf *et al*. 2014) 與 SILVA 19Rum (Henderson

et al. 2019)、人類腸道專用的 HITdb (Ritari *et al*. 2015)……等，可提升特定棲地微生物屬與種分類階層的分辨率。

結論

次世代定序的普及促進環境基因體研究的蓬勃發展，不斷精進的演算法可極大化的提高 16S rRNA 基因擴增片段之分辨率，但如何連結定序資料與正確的微生物物種分類指派，仍是我們需要努力的課題。本研究結果也揭示了物種分類指派流程與參考序列訓練集的選擇，對物種分類指派結果之影響，隨著 16S rRNA 基因參考序列資料庫不斷地更新，進行高解析的 ASVs 資料集分析時，更應該謹慎選擇反覆評估，才能更準確地描述環境與微生物多樣性間的關係。

引用文獻

Amann, R. and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. 24:555–565. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00557.x

Amir, A., D. McDonald, J. A. Navas-Molina, E. Kopylova, J. T. Morton, Z. Zech Xu, E. P. Kightley, L. R. Thompson, E. R. Hyde, A. Gonzalez, and R. Knight. 2017. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. mSystems 2:e00191-16. doi:10.1128/mSystems.00191-16

Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. Johnson, and S. P. Holmes. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13:581–583. doi:10.1038/nmeth.3869

Callahan, B. J., P. J. McMurdie, and S. P. Holmes. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. ISME J. 11:2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119

Callahan, B. J., J. Wong, C. Heiner, S. Oh, C. M. Theriot, A. S. Gulati, S. K McGill, and M. K. Dougherty. 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. Nucleic Acids Res. 47:e103. doi:10.1093/nar/gkz569

Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. Mcgarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje. 2014. Ribosomal database project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 42:D633–D642. doi:10.1093/nar/gkt1244

Curry, C. J., J. F. Gibson, S. Shokralla, M. Hajibabaei, and D. J. Baird. 2018. Identifying North American freshwater invertebrates using DNA barcodes: Are existing COI sequence libraries fit for purpose? Freshw. Sci. 37:178–189. doi:10.1086/696613

DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl. Environ. Microbiol. 72:5069–5072. doi:10.1128/aem.03006-05

Edgar, R. C. 2016. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. bioRxiv 081257. doi:10.1101/081257

Escobar-Zepeda, A., E. E. Godoy-Lozano, L. Raggi, L. Segovia, E. Merino, R. M. Gutiérrez-Rios, K. Juarez, A. F. Licea-Navarro, L. Pardo-Lopez, and A. Sanchez-Flores. 2018. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. Sci. Rep. 8:12034. doi:10.1038/s41598-018-30515-5

Gilbert, J. A., F. Meyer, D. Antonopoulos, P. Balaji, C. T. Brown, C. T. Brown, N. Desai, J. A. Eisen, D. Evers, D. Field, W. Feng, D. Huson, J. Jansson, R. Knight, J. Knight, E. Kolker, K. Konstantindis, J. Kostka, N. Kyrpides, R. Mackelprang, A. McHardy, C. Quince, J. Raes, A. Sczyrba, A. Shade, and R. Stevens. 2010. Meeting report: The terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. Stand. Genom. Sci. 3:243–248.

Glöckner, F. O., P. Yilmaz, C. Quast, J. Gerken, A. Beccati, A. Ciuprina, G. Bruns, P. Yarza, J. Peplies, R. Westram, and W. Ludwig. 2017. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. J. Biotechnol. 261:169–176. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198

Henderson, G., P. Yilmaz, S. Kumar, R. J. Forster, W. J. Kelly, S. C. Leahy, L. L. Guan, and P. H. Janssen. 2019. Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework. PeerJ 7:e6496. doi:10.7717/peerj.6496

McClenaghan, B., N. Fahner, D. Cote, J. Chawarski, A. McCarthy, H. Rajabi, G. Singer, and M. Hajibabaei. 2020. Harnessing the power of eDNA metabarcoding for the detection of deep-sea fishes. PLoS One 15:e0236540. doi:10.1371/journal.pone.0236540

Mizrahi-Man, O., E. R. Davenport, and Y. Gilad. 2013. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: Evaluation of effective study designs. PLoS One 8:e53608.

doi:10.1371/journal.pone.0053608

Murali, A., A. Bhargava, and E. S. Wright. 2018. IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. Microbiome 6:140. doi:10.1186/s40168-018-0521-5

O'Leary, N. A., M. W. Wright, J. R. Brister, S. Ciufo, D. Haddad, R. McVeigh, B. Rajput, B. Robbertse, B. Smith-White, D. Ako-Adjei, A. Astashyn, A. Badretdin, Y. Bao, O. Blinkova, V. Brover, V. Chetvernin, J. Choi, E. Cox, O. Ermolaeva, C. M. Farrell, T. Goldfarb, T. Gupta, D. Haft, E. Hatcher, W. Hlavina, V. S. Joardar, V. K. Kodali, W. Li, D. Maglott, P. Masterson, K. M. McGarvey, M. R. Murphy, K. O'Neill, S. Pujar, S. H. Rangwala, D. Rausch, L. D. Riddick, C. Schoch, A. Shkeda, S. S. Storz, H. Sun, F. Thibaud-Nissen, I. Tolstoy, R. E. Tully, A. R. Vatsan, C. Wallin, D. Webb, W. Wu, M. J. Landrum, A. Kimchi, T. Tatusova, M. DiCuccio, P. Kitts, T. D. Murphy, and K. D. Pruitt. 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res. 44:D733–D745. doi:10.1093/nar/gkv1189

Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276:734–740. doi:10.1126/science.276.5313.734

Park, S. C. and S. Won. 2018. Evaluation of 16S rRNA databases for taxonomic assignments using mock community. Genomics Inform. 16:e24. doi:10.5808/GI.2018.16.4.e24

Parks, D. H., M. Chuvochina, D. W. Waite, C. Rinke, A. Skarshewski, P. A. Chaumeil, and P. Hugenholtz. 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nat. Biotechnol. 36:996–1004. doi:10.1038/nbt.4229

Parks, D. H., M. Chuvochina, P. A. Chaumeil, C. Rinke, A. J. Mussig, and P. Hugenholtz. 2020. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. Nat. Biotechnol. 38:1079–1086. doi:10.1038/s41587-020-0501-8

Patel, S. and R. S. Gupta. 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70:406–438. doi:10.1099/ijsem.0.003775

Prodan, A., V. Tremaroli, H. Brolin, A. H. Zwinderman, M. Nieuwdorp, and E. Levin. 2020. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. PLoS One 15:e0227434. doi:10.1371/journal.pone.0227434

Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glöckner. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41:D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219

Ritari J., J. Saloärvi, L. Lahti, and W. M. de Vos. 2015. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. BMC Genom. 16:1056. doi:10.1186/s12864-015-2265-y

Rosen, M. J., B. J. Callahan, D. S. Fisher, and S. P. Holmes. 2012. Denoising PCR-amplified metagenome data. BMC Bioinform. 13:283. doi:10.1186/1471-2105-13-283

Seedorf, H., S. Kittelmann, G. Henderson, and P. H. Janssen. 2014. RIM-DB: A taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. PeerJ 2:e494. doi:10.7717/peerj.494

Vogel, T. M., P. Simonet, J. K. Jansson, P. R. Hirsch, J. M. Tiedje, J. D. van Elsas, M. J. Bailey, R. Nalin, and L. Philippot. 2009. TerraGenome: A consortium for the sequencing of a soil metagenome. Nat. Rev. Microbiol. 7:252. doi:10.1038/nrmicro2119

Walker, T. S., H. P. Bais, E. Grotewold, and J. M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. 132:44–51. doi:10.1104/pp.102.019661

Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rrna sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 73:5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07

Wang, S., X. Bao, K. Feng, Y. Deng, W. Zhou, P. Shao, T. Zheng, F. Yao, S. Yang, S. Liu, R. Shi, Z. Bai, H. Xie, J. Yu, Y. Zhang, Y. Zhang, L. Sha, Q. Song, Y. Liu, J. Zhou, Y. Zhang, H. Li, Q. Wang, X. Han, Y. Zhu, and C. Liang. 2021. Warming-driven migration of core microbiota indicates soil property changes at continental scale. Sci. Bull. 66:2025–2035. doi:10.1016/j.scib.2021.01.021

Zhou, J., Z. He, Y. Yang, Y. Deng, S. G. Tringe, and L. Alvarez-Cohen. 2015. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. mBio. 6:e02288-14. doi:10.1128/mBio.02288-14

Analysis of Taxonomic Annotation Strategies for Soil Microbiota Amplicon Sequencing

Han-Wei Chen[1], Mei-Chun Lin[2], Suh-Jen Lin[3], Ching-Shan Tseng[4], and Yuan-Kai Tu[1,*]

Abstract

Chen, H. W., M. C. Lin, S. J. Lin, C. S. Tseng, and Y. K. Tu. 2022. Analysis of taxonomic annotation strategies for soil microbiota amplicon sequencing. J. Taiwan Agric. Res. 71(3):267–279.

The 16S rRNA gene amplicon sequencing is a high-throughput and gold-standard approach employed in DNA barcoding technique for soil microbial community study. DADA2 implements the divisive amplicon denoising algorithm and produces higher-resolution data sets of amplicon sequence variants (ASVs) for the Illumina sequencing platform. The importance is even greater to link microbial binomial nomenclature and high-resolution ASVs data for subsequent community diversity analysis. In this study, we performed a comparative study of three taxonomic assignment pipelines using DADA2 processed datasets. The efficiency of taxonomic annotation showed that DADA2's assign Taxonomy algorithm goes well with the SILVA 138 reference training set (with Species). Here we used a binary classification test to evaluate the ability of four DADA2-formatted reference training sets (SILVA 138, SILVA 138.1, GTDB, and RefSeq + RDP) in soil microbial classification. The results showed that the GTDB training set had the highest sensitivity, and both SILVA 138 and SILVA 138.1 training sets had the best specificity. While the RefSeq + RDP training set showed the best performing descriptors of accuracy, coverage, Matthews correlation coefficient, and positive predictive value than other training sets. However, the results of microbial diversity analysis showed that the taxonomic assignment of the GTDB training set was the closest to the original ASVs data, reflecting the best soil microbial community compositions. This study revealed that the selection of the taxonomic assignment pipelines and the 16S rDNA reference training set had a great impact on microbial identification. With the continuous updating of the 16S rDNA reference database, we should curate our taxonomic profiling results more carefully to obtain a better microbial diversity description.

Key words: Soil microbiota, Amplicon sequencing, DNA barcoding, DADA2.

Received: November 9, 2021; Accepted: May 30, 2022.
[*] Corresponding author, e-mail: yktu@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Biing-Wen
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Yang, Chwen-Ming
Department of Post Modern Agriculture, MingDao Unviersity
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

English Editorial Board

Chang, Chung-Jan
Department of Plant Pathology, University of Georgia, USA
Chung, Kuang-Ren
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Wang, Yin-Tung
Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, USA
Yang, Chin-Cheng Scotty
Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA

Invited Editor

Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chen, Yu-Kun
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chan, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 71 No. 3 September 30, 2022

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Ting-Fang Hsieh
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	https://www.tari.gov.tw/jtar; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC; Tel: +886-4-2226-0330